

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

Distribución tisular de los receptores Toll-like (TLR) 3, 7 y 9 en el cerdo y efecto *in vitro* de la infección por el virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino en su regulación en macrófagos alveolares porcinos.

Liudmila Kuzemtseva

Tesis Doctoral

04 de Mayo, 2012

Dirigida por la Dra. Laila Darwich Soliva

Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals
Universitat Autònoma de Barcelona

Laila Darwich Soliva, profesora del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

HAGO CONSTAR,

Que el trabajo “Distribución tisular de los receptores Toll-like (TLR) 3, 7 y 9 en el cerdo y efecto *in vitro* de la infección por el virus de síndrome respiratorio y reproductivo porcino en su regulación en macrófagos alveolares porcinos”, presentado por Liudmila Kuzemtseva para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha sido realizado en el Centro en Recerca y Sanitat Animal (CReSA) y bajo mi dirección.

Para que conste, firmo la presente,

Laila Darwich Soliva

Bellaterra, 04 de mayo de 2012

El estudio de doctorado de Liudmila Kuzemtseva ha estado financiado por una beca FI (Ajuts destinats a universitats i centres de recerca per a la contractació de personal investigador novel) de l'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) de la Generalitat de Catalunya.

Este trabajo ha estado financiado por un proyecto subvencionado del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2008-05708-C02-02/GAN).

Especialmente dedicada a mi madre

AGRADECIMIENTOS

El tiempo pasa volando...

El dicho ruso dice que “el camino se pasa andando”. Pero sin el apoyo de los amigos sería un camino mucho más duro... Así que agradezco a toda la gente que ha estado a mi lado durante todos estos años que he estado viviendo en Cataluña.

Quiero empezar por la gente que siempre quedará en mi corazón y que son las primeras personas a quien a mí me gustaría agradecerles. Son David Prandi, Núria Colomer y Gemma Castellà, que han sido las primeras personas que conocí y que me han apoyado estos años que llevo en la Universitat Autònoma de Barcelona.

También me gustaría recordar a mis compañeros del Máster en Seguridad Alimentaria: Roger, Vanesa, Fabio, Jesus, Natalia y Begonia.

Doy las gracias a Gor, que ha sido como mi ángel de la guarda que ha aparecido en un momento complicado de mi vida y me ha guiado para hacer un trabajo de investigación con el grupo de enfermedades infecciosas. Especialmente agradezco a Enric Mateu por su gran ayuda, que sin ella este trabajo tan duro, en ocasiones, ha podido llegar a su fin.

Laila, te agradezco mucho a ti, por tu esperanza - que como sabemos “muere la última” ¡Me has apoyado mucho en la recta final del trayecto! Gracias a Mariona, Marga, Jordi, Montse, Gabriel, Ana. Gracias a ti, Ariadna, por tu cochecito que me ha permitido hacer los viajes a Barcelona.

Gracias a todo el equipo del CReSA. Agradezco a Ivan y Eugenia que me han enseñado muchas técnicas del laboratorio. ¡Gracias por vuestra paciencia! Gracias a Mónica y Rosa, Nuria y Esmeralda, Sonia y Marta, Gerard y Tufaria, Irene y Alexel.

¡¡¡Os agradezco a todos por estar ahí!!! En el camino de nuestra vida siempre conocemos a gente y creo que son la gente especial, con la que aprendemos el sentido de la vida. Haciendo este trabajo he aprendido mucho de la ciencia y además mucho de la vida. Y no se que es más importante... Es una experiencia que quedara para siempre en mis recuerdos.

RESUMEN

Los receptores Toll-like (TLRs), en particular los que se encuentran en vesículas intracelulares de origen endosomal (TLR3, TLR7 y TLR9), están involucrados en la respuesta innata antivírica. La unión a sus respectivos ligandos conduce a la activación de cascadas intracelulares que resultan en una producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α) y antivirales (interferones de tipo I). Existe muy poca información sobre la distribución celular y tisular de estos receptores en la especie porcina así como su regulación en condiciones normales o de infección.

En el primer estudio de la presente tesis se valoró la distribución tisular de los TLRs endosomales en pulmón y tejidos linfoides primarios y secundarios de cerdos sanos de distintas edades. El marcaje del TLR9 se realizó con un anticuerpo comercial con reactividad específica para el porcino. En cambio, en el caso de TLR3 y TLR7 los anticuerpos se dirigían a las moléculas humanas pero, supuestamente, poseían reactividad cruzada con las moléculas de origen porcino. Los resultados obtenidos permitieron valorar la distribución del TLR9 en los distintos tejidos examinados, pero no la de los TLR3 y TLR7 ya que el uso de los anticuerpos dirigidos frente a estos dos últimos receptores no produjo resultados satisfactorios. Así, el marcaje obtenido con el anticuerpo anti-TLR3 fue muy variable en función del tejido utilizado; es decir, en algunos órganos como el pulmón, tonsila o linfonodos parecía ser específico, pero en otros como en el hígado, producía un intenso color de fondo inespecífico. Por el contrario, sí hubo un marcaje específico para el TLR9 que reveló una expresión constitutiva de dicho receptor en células de la periferia de los folículos linfoides de los linfonodos, la tonsila y las placas de Peyer, (células de tipo epitelial, dendríticas, macrófagos o linfocitos) un hecho que sugería que este receptor probablemente puede jugar un papel importante en la activación el sistema inmunitario de los cerdos a partir de las 3 semanas de vida.

El segundo estudio de esta tesis consistió en determinar la variación de la expresión de TLR3, TLR7 y TLR9 a lo largo del tiempo en una población de células presentadoras de antígeno. La población de estudio elegida fue la de macrófagos alveolares porcinos (PAMs). Los resultados de la cinética de expresión mediante citometría de flujo nos mostró que estas células presentaban una expresión basal elevada de TLR3 y TLR9 pero no de TLR7. Una de las explicaciones posibles para este marcaje basal señalaría a la necesaria manipulación de estas células antes de ser congeladas como responsable de esta expresión.

Por otra parte, es difícil conocer con exactitud el ambiente en el cual se encontraban los PAMs en el pulmón antes de ser recogidos (concentración de interleuquinas, quimioquinas, otras moléculas, etc). Dado que los animales donantes estaban sanos, no presentaban ningún tipo de lesión pulmonar y eran libres de los patógenos víricos comunes del cerdo (circovirus porcino de tipo 2, influenza A y virus del PRRS entre otros) la causa de esta elevada expresión no está clara. En cuanto a la expresión de TLR7, apenas se pudo detectar una expresión basal en los PAMs utilizados.

Para el tercer estudio de esta tesis se buscó un modelo de infección con un virus RNA que pudiera influir en la regulación de estos TLRs y además pudiera añadir nuevos conocimientos respecto a la inmunopatogenia de dicha infección. En el campo de las enfermedades infecciosas del porcino, una de las mayores incógnitas inmunológicas del momento la encontramos en la infección con el virus del PRRS. Los resultados de este estudio demostraron que dos cepas del mismo genotipo del virus del PRRS causaban una regulación diferente del TLR3 y del patrón de citoquinas pro-inflamatorias. En concreto, en los estudios de citometría de flujo, la cepa 3262 al inducir la expresión de TLR3 en PAMs, sobre todo a dosis elevadas (m.o.i=1), activaría la producción de $\text{TNF-}\alpha^+$; en cambio, la cepa 3267 o la cepa vacunal DV activaron TLR3 con menor intensidad y no inducirían $\text{TNF-}\alpha$; sugiriendo en definitiva, que la regulación del patrón de citoquinas antivirales o pro-inflamatorias en los macrófagos dependería del tipo de cepa utilizada. Resulta interesante señalar que a pesar de las diferencias observadas en la citometría de flujo respecto el porcentaje de células que expresaban TLR3 y en la intensidad de su expresión según el tipo de virus utilizado, la expresión relativa del mRNA no parecía modificarse. Estas diferencias resultan interesantes y apuntan a que distintas cepas de campo de genotipo europeo podrían ejercer un efecto regulador de diferente intensidad sobre moléculas inhibitorias de la cascada de señalización de los TLRs. Además esta regulación parece depender de diferentes factores tales como: la cepa vírica, el tiempo de infección y la dosis infectiva inicial. Nuestros resultados pueden ser útiles para abrir y conducir una nueva línea de investigaciones orientadas hacia el área de la inmunidad innata frente al virus del PRRS.

SUMMARY

Toll-like receptors (TLRs), particularly those found within intracellular vesicles of endosomal origin (TLR3, TLR7 and TLR9), are involved in the innate antiviral responses. Binding of those receptors to their respective ligands leads to the activation of intracellular cascades resulting in the release of pro-inflammatory cytokines (TNF- α) and antiviral (type I) interferons. The knowledge on the distribution of those receptors in porcine organs, tissues and cells and its regulation in physiological states or in infection is scarce.

In the first study of the present thesis the distribution of endosomal TLRs in lung and primary and secondary lymphoid tissues of healthy pigs of different ages was assessed. Labeling of TLR9 was performed using a commercial antibody with specific reactivity for the porcine TLR9. For TLR3 and TLR7 the antibodies used in the study were directed to human molecules but they were supposed to cross-react with the porcine counterpart molecules. The results allowed the assessment of the distribution of TLR9 in the different tissues examined, but not that of TLR3 and TLR7 since the use of antibodies directed against the latter two receptors did not yield satisfactory results. Thus, labeling obtained with the anti-TLR3 antibody was highly variable depending on the tissue examined, that is, in some organs such as lungs, tonsils or lymph nodes labeling was apparently specific but in others, as in the liver, the use of that antibody resulted in an intense non-specific background. By contrast, TLR9 labeling was specific and revealed a constitutive expression of this receptor in cells of the periphery of lymphoid follicles of lymph nodes, tonsils and Peyer's patches (epithelial cells, dendritic cells, macrophages or lymphocytes) a fact suggesting that this receptor can probably play an important role in activating the immune system of pigs of 3 week-old piglets.

The second study of this thesis was aimed to determine the variation of the expression of TLR3, TLR7 and TLR9 over time in a population of antigen-presenting cells. Porcine alveolar macrophages (PAMs) were used for this purpose. The results of the kinetics of expression as assessed by flow cytometry showed that PAMs had a high basal expression of TLR3 and TLR9 but not of TLR7. A possible explanation for this basal labeling could point to the unavoidable manipulation of PAMs needed for their collection. Moreover, it is difficult to know precisely the environmental conditions in which PAMs were in the lungs before being collected (concentration of interleukins, chemokines, presence of other molecules, etc.).

Since PAM donors were healthy, showed no lung lesions and were demonstrated to be free of common viral pathogens of pigs (porcine circovirus type 2, influenza A and PRRS virus among others) the cause of this elevated expression remains unclear. As for TLR7, basal expression in the PAMs used was low or nil.

The third study of the present thesis aimed to a model of infection with an RNA virus that might influence the regulation of these TLRs and also could add new knowledge regarding the pathogenesis of the infection. In the field of infectious diseases of swine, one of most interesting models of RNA virus infections is PRRS virus for which immunopathogenesis is largely understood. The results of this study showed that two strains of the same genotype of PRRS virus resulted in a different regulation of TLR3 and in a different pattern of pro-inflammatory cytokines. Specifically, in flow cytometry experiments, strain 3262, induced the expression of TLR3 in PAMs, particularly at high multiplicities of infection (m.o.i = 1) and triggered the production of $\text{TNF-}\alpha^+$ whereas strain 3267 or the vaccine strain DV resulted in lower TLR3 expression and did not induce $\text{TNF-}\alpha$, suggesting ultimately that the regulation of the antiviral or pro-inflammatory cytokine patterns in macrophages depends on the strain used. Interestingly, despite the differences observed in flow cytometry for TLR3, the relative mRNA expression did not apparently change under different circumstances. This was an interesting observation that suggests that different field strains of genotype I PRRSV might exert a regulatory effect of different intensity on inhibitory molecules of the signaling cascade of TLRs. Furthermore, this regulation seems to depend on various factors such as the viral strain, the time of infection and the multiplicity of infection. Our results may be useful as a basis for further studies in the area of innate immunity against PRRS virus.

LISTADO DE ABREVIATURAS

CpG-ODN	CpG oligodeoxynucleotides
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
dsRNA	double stranded RiboNucleic Acid
EAV	Equine arteritis virus
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-1, IL-6, IL-8	Interleuquina - 1, 6, 8
IL-1R	Receptor de la Interleukina-1
INFs	Interferones
IRF	Interferon Regulatory Factor
LDV	Lactate dehydrogenase-elevating virus
LRR	Leucine-Rich Repeat
mAb	Anticuerpo monoclonal
MAMP	Microbial Associated Molecular Pattern
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NF-kB	Factor Nuclear kappa beta
NK células	células Natural Killer
OD	Optical Density (Densidad Óptica)
pAb	Anticuerpo policlonal
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PCV2	Circo Virus Porcino 2
pDC	células Dendríticas Plasmocitoides
Poly I:C	Polyinosinic:Polycytidylic Acid
PRR	Pattern Recognition Receptors
RNA	RiboNucleic Acid
SFB	Suero fetal bovino
SHFV	Simian Hemorrhagic Fever Virus
ssRNA	single stranded RiboNucleic Acid
TCR	T cell receptor
TIR	Toll/Interleukin-1 Receptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLRs	Receptores Toll-like
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR domain containing adaptor inducing IFN- β
VAC	Virus Asociado a Células

ÍNDICE

Páginas

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta inmune innata	4
1.1.1. Visión general de la respuesta inmune innata	4
1.1.2. Receptores de reconocimiento de patógenos	6
1.1.2.1. Origen ontogénico	6
1.1.2.2. Tipo de receptores PRR	7
1.2. Receptores Toll-like	
1.2.1. Antecedentes históricos	8
1.2.2. Estructura de los TLRs	9
1.2.3. Distribución de los TLRs en los distintos tipos celulares	13
1.2.4. Vías de señalización mediadas por los TLRs	13
1.2.5. Distribución orgánica y tisular de los TLRs	15
1.2.6. Participación de los TLRs en la respuesta innata frente a las infecciones víricas	17
1.3. Infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino	20
1.3.1. Importancia del síndrome reproductivo y respiratorio porcino	20
1.3.2. Estructura y organización genómica del virus PRRS	21
1.3.3. Diversidad genética y antigénica del PRRSV	22
1.3.4. Células diana del PRRSV	25
1.3.4.1 Replicación del PRRSV	26
1.3.5. PRRSV y los mecanismos de la respuesta inmune innata	27
1.3.5.1. Regulación de los TLR por el PRRSV	29
2. OBJETIVOS	31

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL	32
3.1.1. Animales donantes	32
3.1.1.1. Pruebas de infección <i>in vitro</i>	32

3.1.1.2. Pruebas de Inmunohistoquímica	32
3.1.2. Obtención de macrófagos alveolares porcinos	33
3.1.3. Cepas víricas	33
3.1.4. Cultivo e infección <i>in vitro</i> de los PAMs	35
3.1.5. Anticuerpos	36
3.2. MÉTODOS	37
3.2.1. Ensayos de Inmunohistoquímica (IHQ)	37
3.2.1.1. Preparación de las muestras	37
3.2.1.2. Sistemas de fijación de los tejidos	37
3.2.1.3. Inclusión en bloques de parafina	38
3.2.1.4. Tratamiento enzimático	38
3.2.1.5. Marcaje IHQ	39
3.2.1.6. Lectura IHQ	39
3.2.2. Citometría de Flujo (CMF)	40
3.2.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	40
3.2.3.1. Marcaje de los TLRs	40
3.2.3.2. Marcaje del PRRSV.....	41
3.2.4. Western Blot (WB)	41
3.2.5. ELISA de captura	42
3.2.5.1. ELISA de IL-10	42
3.2.5.2. ELISA de TNF $-\alpha$	42
3.2.5.3. Recta calibración con los estándares	43
3.2.6. RT-PCR a tiempo real (RT-PCR rt)	43
3.2.6.1. Extracción RNA	43
3.2.6.2. Cuantificación y calidad del RNA	44
3.2.6.3. Preparación de los estándares de la RT-PCR rt para los TLRs	44
3.2.6.4. Preparación de los estándares de la RT-PCR rt para el virus.....	45
3.2.6.5. Transcripción reversa y amplificación del DNA muestra por el método TaqMan.....	48
3.2.7. Análisis estadístico	49

4. RESULTADOS

4.1. Distribución de los TLRs en tejidos de cerdo mediante inmunohistoquímica (IHQ)	50
4.1.1. Marcaje del TLR3	50
4.1.2. Marcaje del TLR7	51
4.1.3. Marcaje del TLR9	51
4.2. Especificidad de los anticuerpos utilizados frente a los TLRs porcinos	59
4.2.1. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en PAMs	59
4.2.2. Técnica de Western Blot (WB) en PAMs	61
4.2.3. Citometría de Flujo (CMF) para los distintos TLR aplicada a PAMs	61
4.3. Pruebas de infección <i>in vitro</i> de los PAMs	64
4.3.1. Capacidad replicativa de las cepas de PRRSV del ensayo	64
4.3.1.1. Cinética de replicación viral mediante TCID ₅₀ por IFI	64
4.3.1.2. Cuantificación título viral mediante RT-PCR a tiempo real	66
4.3.1.3. Determinación de citoquinas en sobrenadantes de PAMs infectados.....	69
4.4. Regulación de los TLRs en PAMs infectados con distintas cepas de PRRSV	70
4.4.1. Regulación proteica de los TLRs mediante CMF	70
4.4.2. Regulación del mRNA de los TLRs mediante RT-PCRrt	80
5. DISCUSIÓN	82
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	94
8. ANNEXOS	
8.1. Publicaciones	111
8.2. Composición de los bufferes	112

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta inmune innata

1.1.1. Visión general de la respuesta inmune innata

El concepto básico de la respuesta innata surge de los estudios de Ilya Ilyich Mechnikov (1845-1916) quien describió por primera vez los fagocitos y la función fagocítica, lo que le valió ganar el Premio Nobel en 1908 conjuntamente con Paul Ehrlich (1854-1915). En ese momento, Mechnikov creía que la mayor parte de la defensa innata, o quizás toda, se basaba en la fagocitosis. Por su parte, la teoría de la inmunidad de cadena lateral, postulada por Paul Ehrlich, establecía por primera vez la base química de la especificidad de la respuesta inmune con el reconocimiento específico de antígeno y la liberación de “*cadena lateral*” con función antitóxica; lo que actualmente denominamos anticuerpos.

Durante la mayor parte del siglo XX, la investigación se centró principalmente en la respuesta adaptativa o adquirida (específica) y no ha sido hasta la década de 1990 cuando ha cambiado el enfoque y se ha valorado la importancia de la inmunidad innata y su contribución a la defensa del organismo, fundamentalmente a través del descubrimiento de los receptores Toll-like (TLRs) y otros receptores de reconocimiento de patógenos.

La respuesta inmune se clasifica en dos grandes tipos: la inmunidad innata o natural y la adaptativa o adquirida. A la inmunidad innata pertenecen todas aquellas respuestas del sistema inmune en las que no media el reconocimiento específico de un antígeno ni el desarrollo de memoria, mientras que la inmunidad adaptativa requiere el reconocimiento específico de antígenos y genera memoria inmunológica. La tabla 1 muestra las similitudes y diferencias entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Desde un punto de vista evolutivo, los mecanismos de fagocitosis asociados a la captación de nutrientes, aparecen ya en protozoos. La inmunidad natural se desarrolla probablemente en los primeros invertebrados a través de la producción de péptidos o moléculas antibacterianas o antivíricas. La inmunidad innata es, por lo tanto, un sistema evolutivamente antiguo, fijo, que no varía sustancialmente a lo largo de la vida del individuo que sirve para la protección genérica del organismo contra patógenos, llevando a cabo la detección y eliminación de los microorganismos en las horas inmediatas a su invasión.

Introducción

A pesar de su carácter relativamente inespecífico, los fenómenos que se producen en la respuesta inmune innata tienen un efecto clave sobre el desarrollo de la respuesta adaptativa que viene mediado fundamentalmente por las sustancias (quimioquinas y citoquinas) que emiten las células que intervienen en la respuesta natural.

Tabla 1. Elementos distintivos entre la respuesta inmune innata y adaptativa

Característica inmunológica	Respuesta innata	Respuesta adaptativa
Reconocimiento de antígenos específicos del patógeno	NO	SI
Discriminación de estructuras moleculares similares	NO	SI
Distribución clonal	NO	SI
Generación de memoria inmunológica	NO	SI
Reconocimiento de patógenos con estructuras similares	SI	NO
Desencadenamiento de respuestas inmediatas	SI	NO
Heredable	SI	NO

Entre las funciones más relevantes de la inmunidad innata (Enlens y Bulfone-Paus, 2004; Blasi *et al.*, 2005) se pueden destacar:

- a) El reconocimiento (genérico) de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), a través de receptores especializados denominados Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptors*). Este reconocimiento de moléculas propias de patógenos (por ejemplo lectinas, lipoproteínas u otras sustancias) desencadena respuestas complejas que pueden conducir a la eliminación del patógeno. Entre los mecanismos que se pueden activar por esta vía se encuentran la cascada del complemento, la liberación de citoquinas, etc.
- b) La acción efectora de determinados tipos celulares. Tales como la fagocitosis de bacterias o partículas extrañas a cargo de los neutrófilos y macrófagos; la acción citotóxica natural de las células natural killer (NK), la degranulación de mastocitos, etc. En este apartado, y entre la respuesta innata y la adquirida se situaría la emisión de citoquinas por las células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas, macrófagos, etc.) (Ahuja *et al.*, 1999).

Introducción

- c) Una función orientativa (instructiva) que determina la dirección e intensidad del desarrollo de la respuesta inmune adaptativa al contribuir a una polarización Th1 o Th2 (Iwasaki y Medzhitov, 2004; Kaufmann y Schaub, 2005; Mazzoni y Segal, 2004). Esta polarización determinará el desarrollo de respuestas efectoras específicas y eficientes y la generación de células de memoria para prevenir una posible reinfección con el mismo agente en el futuro (Hornet *et al.*, 2002; Hornef, 2005; Portnoy, 2005).

Como vemos, el control de la infección puede producirse inicialmente con la participación única de componentes innatos del sistema inmune y, si esta respuesta es insuficiente, se produce el desarrollo de clones de linfocitos con capacidad efectora efectiva para eliminar una infección. En cualquier caso, los mecanismos de respuesta natural son claves en la defensa del huésped.

1.1.2. Receptores de reconocimiento de patógenos

1.1.2.1. Origen ontogénico

La activación de la respuesta inmune innata depende de un reconocimiento específico de moléculas conservadas en distintos grupos de patógenos que se denominan genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), o con una terminología más ampliamente aceptada de patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs, *Microbial Associated Molecular Patterns*) porque reconocen cualquier microbio, independientemente de su patogenicidad o virulencia. Estos patrones moleculares están muy conservados durante la evolución y no suelen mutar ya que son esenciales para la supervivencia del microbio.

Como se ha mencionado anteriormente, el reconocimiento de los MAMPs se realiza mediante unos receptores de transmembrana conocidos como PRR que se encuentran en distintas células efectoras del sistema inmunitario y en células presentadoras de antígeno tales como macrófagos, células dendríticas (CD) y linfocitos B (Tabla 2). Estos receptores están codificados en la misma línea germinal, es decir, su diversidad es muy limitada y todas las células de un mismo linaje presentan un idéntico PRR, o sea no existe expansión clonal. El reconocimiento de un patógeno sobre su receptor induce su fagocitosis o endocitosis y su posterior destrucción, así como la activación de cascadas de señalización celular que conducen a la respuesta inflamatoria y la inmunidad adaptativa.

1.1.2.2. Tipo de PRR

Los PRR se pueden clasificar en función de su localización, estructura o funcionalidad.

En cuanto a su localización, se reconocen dos tipos de PRR:

- Tipo I: receptores solubles que se encuentran en el ámbito líquido del organismo.
- Tipo II: receptores que se expresan encima de las células del sistema inmunitario innato.

Por su estructura, los PRR se clasifican en receptores con:

- Dominios ricos en repeticiones de leucina.
- Dominios de lectinas dependientes de calcio.
- Receptores *Scavenger*.

Finalmente, en cuanto a su funcionalidad los PRR se clasifican en:

- Secretados: funcionan como opsoninas y permiten la interacción del antígeno con el sistema del complemento y las células fagocíticas. Forman parte de este grupo las colectinas, las lectinas ligadoras de manosas y las transferasas lipídicas.
- Endocíticos: se localizan en la superficie de los fagocitos. Tras el reconocimiento del patógeno, los PRR lo endocitan y lo transportan a los lisosomas para su destrucción. Por ejemplo: el receptor manosa de los macrófagos, los receptores *Scavenger*.
- Señalización: reconocen MAMPs y activan las vías de traducción de la señal para la expresión de los diferentes genes del sistema inmunitario incluido el de las citoquinas proinflamatorias. Por ejemplo: Receptores Toll-like (TLRs), CD14, proteínas NOD.

Entre todos los tipos de PRR los TLRs juegan un papel muy importante en la activación de inmunidad adaptativa.

1.2. Receptores Toll-like

1.2.1. Antecedentes históricos

La primera descripción de los TLRs se realizó en el año 1988, cuando se identificó y clonó por primera vez el gen del receptor de la interleukina-1 (IL-1R), receptor implicado en el sistema inmune innato de los mamíferos (Figura 1). Un año más tarde, Jules A. Hoffmann identificó la proteína Toll en *Drosophila melanogaster* y en 1991 se descubre que tanto el IL-1R como el receptor Toll de la Drosófila presentan una gran homología estructural (Gay y Keith, 1991). El primer TLR humano fue descrito por Nomura *et al* en el año 1994 pero el término concreto de receptores Toll-like no aparece hasta el año 1996 (Lemaitre *et al.*, 1996). En 1997, Medzhitov *et al.*, identificaron un segundo TLR en humano, denominándolo inicialmente como hToll (human Toll) y que actualmente corresponde al TLR4. Estos investigadores demostraron que el TLR4 inducía la activación del factor nuclear kappa beta (NF-kB) y la cascada de síntesis de citocinas proinflamatorias tales como la IL-1, IL-6, IL-8 (Medzhitov *et al.*, 1997; West *et al.*, 2006; Carrillo-Esper, 2003; Taguchi *et al.*, 1996; Armant *et al.*, 2002). Este descubrimiento confirmó la participación de los TLRs como receptores desencadenantes de la respuesta inmune innata (Medzhitov *et al.*, 2000) y su relevante papel en la regulación de la inmunidad adaptiva (Merrell y Falkow, 2004).

Actualmente la familia de los receptores Toll-like consta de 23 miembros (TLR1-TLR23), aunque no todos ellos están bien caracterizados ni demostrados en todas las especies de animales. Por ejemplo, en el ratón no se detecta TLR10, pero sí TLR11, TLR12, TLR13 que no se encuentran a su vez en la especie humana (Underhill, 2004; Underhill y Gantner, 2004). Otros mamíferos pueden expresar TLRs que no se expresan en humano y, especies no mamíferas pueden tener TLRs no expresados en los mamíferos; por ejemplo TLR14 se ha encontrado en peces (Roach *et al.*, 2005).

Por todo ello, la búsqueda de nuevos receptores Toll-like o bien la demostración de estos en distintas especies animales es un objetivo primordial para la inmunología actual.

Introducción

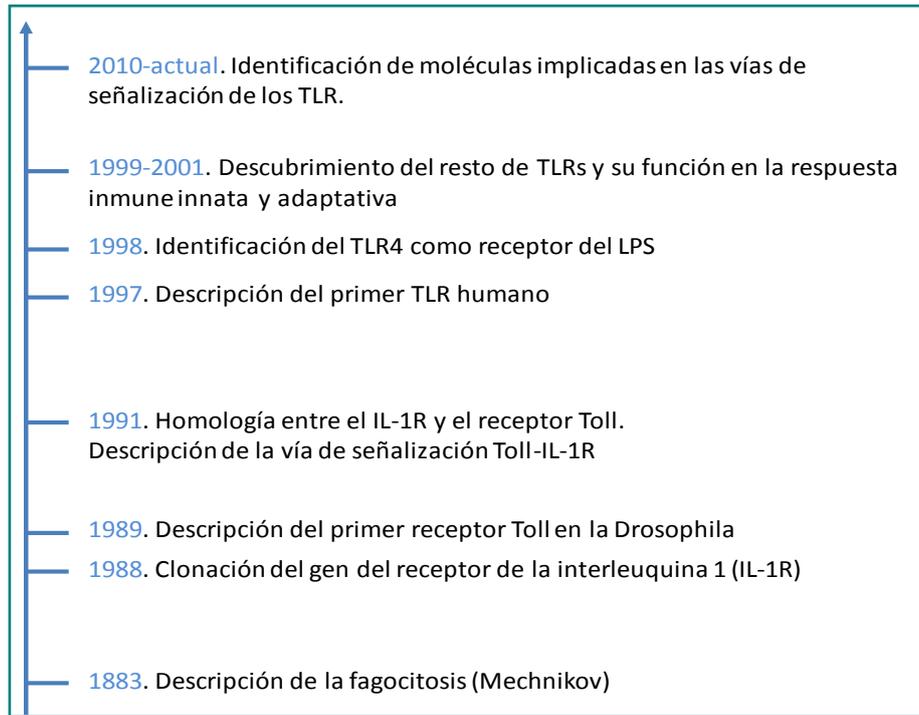


Figura 1. Antecedentes históricos en la investigación de los TLRs.

1.2.2. Estructura de los TLRs

Los TLRs son proteínas de transmembrana de Tipo I¹ que se caracterizan por presentar un dominio de señalización intracelular compartido por los receptores Toll y los receptores de interleuquina 1 llamado TIR (*Toll/Interleukin-1 Receptor*) y un dominio extracelular de reconocimiento de ligando llamado LRR (*Leucine-Rich Repeat*) formado por repeticiones en tándem de un motivo rico en leucina de 19 a 25 aminoácidos (Figura 2).

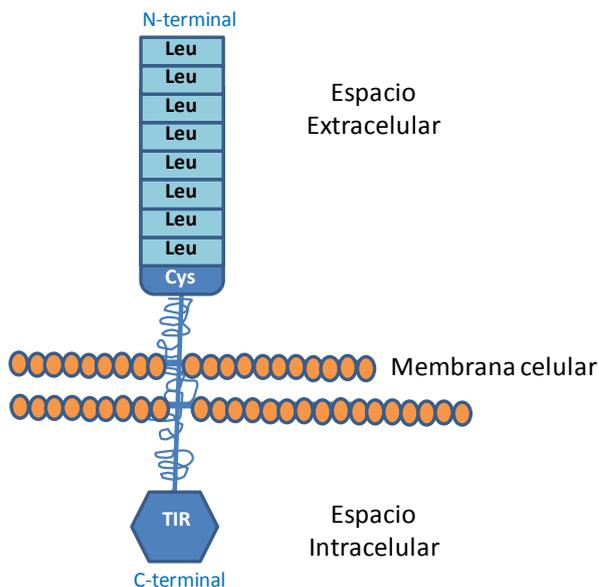


Figura 2. Estructura esquemática de un TLR. Cada receptor está integrado por: una parte extracelular (N-terminal) formada por un conjunto de al menos 18 secuencias repetidas ricas en leucinas (Leu) y de un dominio rico en cisteína (Cys); una única hélice de transmembrana; y un dominio intracelular TIR (Toll-IL1R) que interviene en la transducción de señales al interior de la célula (C-terminal).

¹ Proteínas que atraviesa la membrana plasmática una sola vez (unipaso).

Introducción

En ausencia de ligando, los TLRs tienden a formar dímeros unidos de modo no covalente. En humanos se han descrito hasta 10 TLRs funcionales. La localización subcelular varía según el TLR (Figura 3).

De esta manera, los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se expresan en la superficie celular y tras activarse al reconocer el ligando, migran a los fagosomas. Por otra parte, los TLRs 3, 7, 8 y 9 se expresan en compartimentos intracelulares, principalmente en endosomas y retículo endoplásmico, con los dominios de unión a ligando orientados hacia la luz del endosoma (Armant y Fenton, 2002; Beutler *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Takeda *et al.*, 2003; Akira y Takeda, 2004; Takeda y Akira, 2005).

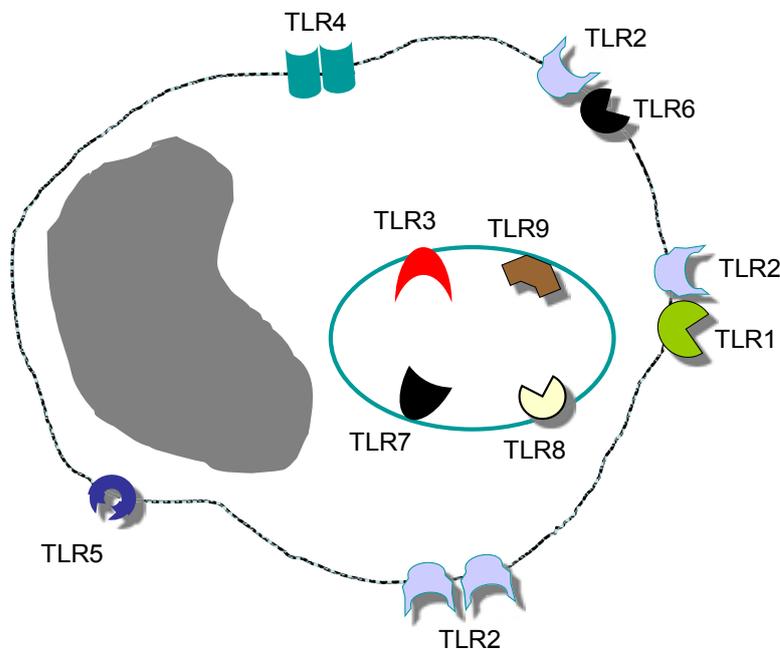


Figura 3. Esquema de la localización de los TLRs en una célula. Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran situados en la membrana plasmática formando normalmente dímeros (excepto en TLR5). Los TLRs 3, 7, 8 y 9 están localizados en el citoplasma de la célula dentro de endosomas, por eso reciben el nombre de endocíticos.

Cada TLR reconoce un grupo de moléculas característico. Los TLRs expresados en la membrana celular reconocen moléculas como los lipopolisacáridos y los lipopéptidos indicando la presencia de patógenos como bacterias, protozoos y hongos que suelen encontrarse en el espacio extracelular; mientras que los TLRs expresados en los compartimentos intracelulares reconocen ácidos nucleicos (DNA, RNA) detectando así infecciones intracelulares por virus (Tabla 2).

Introducción

Tabla 2. Esquema de los receptores TLRs descritos hasta el momento con sus ligandos correspondientes y la ubicación y tipo celular que los expresan.

PRR	Ligando (s) -MAMP	Localización del Ligando	Location de los TLRs	Tipo celular que expresa el TLR
TLR 1	Triacil lipopolipéptidos	Bacteria	Superficie celular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Linfocitos B
TLR 2	Glicolípidos, lipopéptidos, Lipoproteínas Zymosan (Beta -Glucano)	Bacteria Bacteria Hongo	Superficie celular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Mieloides Células Mastoides
TLR 3	RNA doble cadena, poly I:C	Virus RNA	Compartimiento intracelular	Células Dendríticas Linfocitos B
TLR 4	Lipopolisacáridos (LPS) Proteínas de fase aguda Fibrinógeno Heparin Sulfato /Acido Hialurónico	Bacterias Gram negativas Bacteria y células del huésped Células del huésped Células del huésped	Superficie celular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Mieloides Células Mastoides Epitelio Intestinal
TLR 5	Flagelina	Bacteria	Superficie celular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Epitelio Intestinal
TLR 6	Diacil lipopéptidos	<i>Mycoplasma spp</i>	Superficie celular	Monocitos /Macrófagos Células Mastoides Linfocitos B
TLR 7	Imidazoquinoline (Imiquimoid) loxoribina (guanosine analogue) RNA cadena simple	Compuestos sintéticos de pequeño tamaño y virus RNA	Compartimiento intracelular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Plasmocitoides Linfocitos B
TLR 8	RNA de cadena simple		Compartimiento intracelular	Monocitos/Macrófagos Células Mastoides Células Dendríticas
TLR 9	CpG oligodeoxinucleotido no metilados DNA	Bacteria	Compartimiento intracelular	Monocitos/Macrófagos Células Dendríticas Plasmocitoides Linfocitos B
TLR 10	Desconocido	Desconocido	Superficie celular	Monocitos/Macrófagos Linfocitos B
TLR 11	Profilin	Toxoplasma gondii	Compartimiento intracelular	Monocitos/Macrófagos Células hepáticas y renales Epitelio bufeta orina
TLR 12	Desconocido		Desconocido	Neuronas
TLR 13	Desconocido		Desconocido	Neuronas Astrocitos Células del Epidídimo Células Endoteliales

Introducción

El dominio intracelular del receptor es la parte más conservada entre los TLRs, como se puede observar entre el TLR4 humano y de ratón que presentan una homología del 83% (Moreno y Sánchez-Ibarrola, 2003); en cambio la parte extracelular es la más divergente lo que explica la activación por distintos ligandos. Por ejemplo, la homología extracelular entre TLR2 y TLR4 es del 24% y la homología entre el TLR4 de ratón y el TLR4 de humano es del 53%.

Actualmente se está viendo por parte de la industria un incremento significativo de moléculas sintéticas que mimetizan la función de estos ligandos naturales para cada uno de los TLRs descritos (Tabla 3), tanto a nivel de investigación básica (p.e. poly I:C; CpG-ODN) como en la práctica clínica (p.e. imiquimod para el tratamiento de lesiones genitales producidas por el virus del papiloma humano).

Tabla 3. La tabla recoge algunos compuestos que actúan sobre los TLRs que están siendo estudiados como tratamiento de diversas enfermedades humanas.

COMPUESTO FARMACOLÓGICO	DIANA	INDICACIONES
AGONISTAS		
Monofosforil Lípido A (MPL)	TLR4	Adyuvante vacunal de Fendrix (virus Hepatitis B)
MPL RC-529	TLR4	Adyuvante vacunal de Supravax (virus Hepatitis B)
Oligonucleotidos CpG sintéticos 1018 ISS	TLR9	Adyuvante vacunal de Heplisav (virus Hepatitis B)
MPL + hidróxido de aluminio	TLR4	Adyuvante de Cervarix (virus del papiloma humano, HPV)
Tolamba (CpG sintético 1018ISS+alérgeno)	TLR 9	Tratamiento de la rinitis alérgica (alergias al polen)
Aldara (Imiquimod)	TLR7	Tratamiento de verrugas genitales por HPV
PF3512676 (CpG7909)	TLR9	Tratamiento cáncer de pulmón de células no pequeñas
Ampligen (molécula sintética ds RNA)	TLR3	Tratamiento del síndrome de fatiga crónica
ANTAGONISTAS		
TAK-242	TLR4	Tratamiento de la sepsis aguda
ERITORAN (derivado lípido A)	TLR4	Tratamiento de la sepsis aguda

Texto modificado de: <http://www.medmol.es/revisiones/48/>

1.2.3. Distribución de los TLRs en los distintos tipos celulares.

Los TLRs se expresan en las células que realizan la primera línea de defensa del organismo tales como neutrófilos, macrófagos, CD, y células epiteliales y endoteliales de los tejidos (Figura 4). Recientemente se ha descubierto que las células NK en humano también expresan TLRs como ahora el 3, 7 y el 8 (Hart *et al.*, 2005).

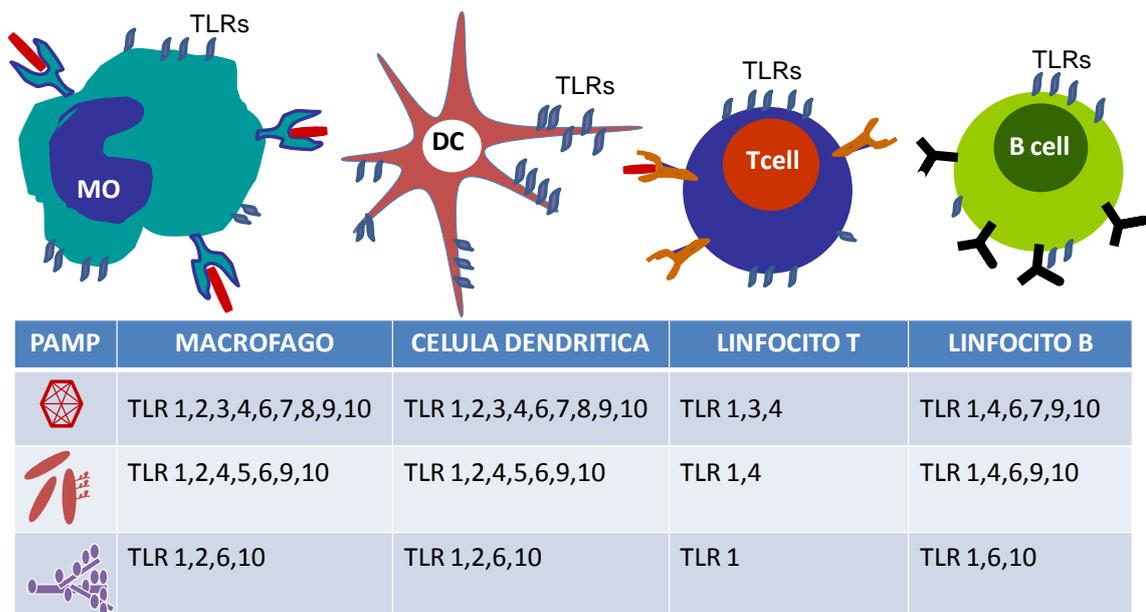


Figura 4. Descripción de los tipos de TLRs que se expresan en las diferentes poblaciones celulares en función al patrón de reconocimiento que presenta el patógeno.

1.2.4. Vías de señalización mediadas por los TLRs

La unión del ligando al TLR provoca un cambio conformacional que origina una cascada de señalización intracelular y finaliza con la producción de mediadores de la inflamación o promoviendo la diferenciación, la proliferación o la apoptosis de la célula. La ruta de señalización intracelular es característica para cada tipo de TLR produciéndose una respuesta diferencial en la célula según el TLR estimulado.

La interacción de las moléculas MAMP con sus respectivos TLRs, facilita la dimerización de estos receptores activando de esta forma la compleja cascada de señalización (Akira y Takeda,

Introducción

2004; Foster *et al.*, 2007; O'Neill, 2006; Pandey y Agrawal, 2006; Amati *et al.*, 2006; Dabbagh y Lewis, 2003; Parker *et al.*, 2007; Fujihara *et al.*, 2003).

Esta cascada de señalización se inicia con la interacción entre el dominio TIR intracitoplasmático (*Toll/IL-1 receptor resistance domain*) de los TLRs con las proteínas adaptadoras MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*), TRIF (*TIR domain containing adaptor inducing IFN- β*) y TRAM (*TRIF-related adapter molecule*), que también tienen dominios TIR, y que funcionan como proteínas transductoras de señales.

Frecuentemente los TLRs utilizan la molécula adaptadora MyD88 pero algunos, como el TLR3 y TLR4, pueden utilizar alternativamente las otras proteínas adaptadoras, con lo que se activan diferentes factores de transcripción y se producen diferentes citoquinas (Figura 5).

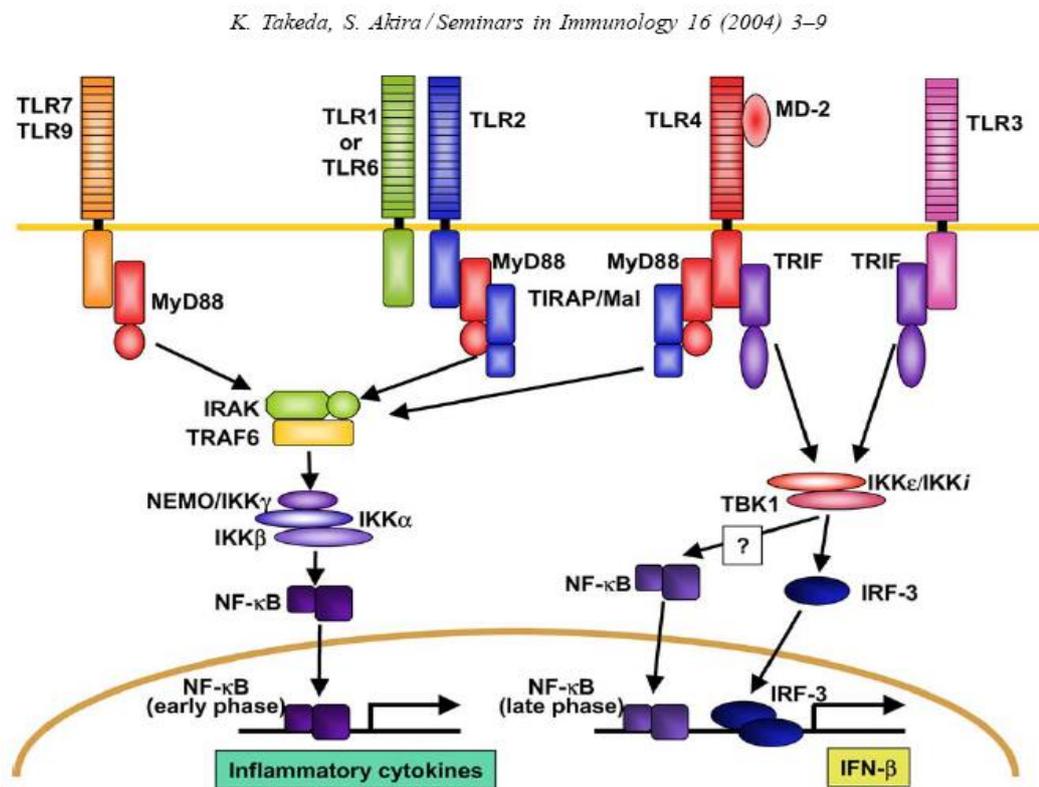


Figura 5. Vías de señalización de las cascadas MyD88-dependiente y MyD88-independiente de los TLRs. Esquema extraído de los autores Takeda y Akira de la revista *Seminars in Immunology* 2004: 16: 3-9 (copyright).

Introducción

Es decir, existen dos vías de señalización alternativas que pueden conducir a dos respuestas distintas:

a. La vía dependiente de MyD88:

La señalización a través de MyD88, que por su parte lleve a una activación rápida del NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Beutler, 2004; Yamamoto y Akirz, 2005), promueve la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-12 e IL-18, entre otras) (Hayashi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 1999; Schnare *et al.*, 2000; Hacker *et al.*, 2000).

b. La vía independiente de MyD88 o TRIF-dependiente:

La señalización a través de las moléculas TIRAP, TRAM y TRIF, activa el IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*) y se estimula la producción de interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) (Takeda y Akira, 2005; O'Neill y Bowie, 2007; O'Neill, 2008).

1.2.5. Distribución orgánica y tisular de los TLRs

La distribución de los TLRs en los distintos tejidos se ha estudiado básicamente en especies de laboratorio y en humanos; en cambio, en animales domésticos y en concreto en el cerdo existe muy poca información al respecto. Los TLR se expresan tanto en tejido linfoide como no linfoide. Por ejemplo, el **TLR1** se expresa intensamente en las células del bazo y en las células de sangre periférica. El **TLR2** se ha detectado en células epiteliales humanas de la mucosa de tejidos linfoides (epitelio de las criptas tonsilares), del bazo (zona marginal y cuerdas esplénicas de la pulpa roja), en la unión corticomedular del timo, en la tonsila (zona medular), intestino delgado (células epiteliales lamina propia), la piel (lámina basal y epidermis), en glándula salivar, en células epiteliales de los conductos biliares del hígado y tubos renales.

El **TLR3** en humanos se expresa en CD mieloides (West *et al.*, 2006; Bautista y Mosqueda, 2005; Schaubert *et al.*, 2007; Ranjith-Kumar *et al.*, 2007). **TLR4** se ha detectado en la superficie de los macrófagos, neutrófilos, CD, linfocitos, monocitos y células endoteliales. **TLR5** se expresa en monocitos, CD y endoteliales. Se expresa también en las células del bazo y leucocitos de sangre periférica. **TLR6** se expresa en leucocitos de sangre periférica y las

Introducción

células del bazo, formando un dímero con el TLR2. **TLR7** se expresa en las células del pulmón, de la placenta, del bazo y en los leucocitos de sangre periférica.

TLR8 fue identificado con el TLR7 y TLR9 y se expresa en grandes cantidades en los leucocitos de sangre periférica y en las células del pulmón. **TLR9** se localiza primero en el retículo endoplasmático, y una vez estimulado se desplaza a los endosomas. En humanos, el TLR9 se expresa en pCD y células B (Hornung *et al.*, 2002). En ratones, TLR9 se localiza en CD mieloides, macrófagos y células B (Hemmi *et al.*, 2000).

Tabla 4. Distribución tisular/orgánica de los TLRs endocíticos descritos en el modelo humano.

TLRs	Órganos/Tejidos
TLR 3	Pulmón Placenta Páncreas Hígado Corazón Cerebro Intestino Linfonódulos Glándula salivar
TLR7	Médula ósea Segmentos de intestino Hígado Pulmón Placenta Linfonódulo mesentérico Tráquea Timo Riñón Piel Bazo Leucocitos de sangre periférica Glándula salivar
TLR 9	Corazón Timo Pulmón Bazo Hígado Riñón Músculo esquelético Duodeno, Jejunio e Ileon Placas de Peyer (ileon) y linfonodos mesentéricos Epitelio asociado al folículo

Introducción

De los TLRs del 10 al 23, de reciente descubrimiento, aun no se ha caracterizado ni su función ni sus ligandos. Estos TLRs se expresan principalmente en células del sistema inmune, principalmente en linfocitos B y en CD plasmocitoides (Hasan *et al.*, 2005). Se cree que el TLR10 así como otros receptores Toll-like participan en la respuesta inmune y puede actuar como correceptores de los TLR1 y TLR6 (Carrillo-Esper, 2003). En la tabla 4 se muestra un resumen de los diversos órganos y tejidos donde se ha descrito la presencia de los diferentes TLRs endocíticos.

1.2.6. Participación de los TLRs en la respuesta innata frente a las infecciones víricas.

Los TLRs desempeñan básicamente tres funciones en la respuesta inmunitaria innata:

- Generan una respuesta inmediata frente al patógeno.
- Estimulan el desarrollo de una respuesta adaptativa eficaz y duradera contra el patógeno.

La detección y el reconocimiento del patógeno son llevadas a cabo por células como las CD y los macrófagos que continuamente se encuentran muestreando el organismo. El reconocimiento por parte de los TLRs conlleva una rápida producción de citoquinas y quimioquinas que indican la presencia del patógeno. Las señales originadas por los TLRs promueven la expresión de moléculas de adhesión tanto en las células epiteliales como en las células hematopoyéticas circulantes promoviendo su llegada a la zona de la infección.

La respuesta innata a un patógeno puede ser decisiva en la regulación de la respuesta adaptativa. Las células presentadoras de antígeno, especialmente las CD, constituyen la interfaz entre ambos tipos de respuestas. Los ligandos para TLRs provocan que las CD maduren convirtiéndose en células presentadoras de antígeno activas al inducir la expresión de moléculas coestimuladoras (como el CD40, el CD80 y el CD86) necesarias para la activación de los linfocitos T. Muchas citoquinas inducidas por los TLRs conducen a la diferenciación de las células T a linfocitos T helper (CD4⁺) o linfocitos T citotóxicos (CD8⁺). Los patrones diferenciales de expresión de los TLRs en los distintos tipos de células presentadoras de antígeno y las diferencias en la distribución de estas células en el organismo explican gran parte de la compleja regulación de las respuestas innata y adaptativa por estas moléculas.

Introducción

En la respuesta innata dirigida a las infecciones víricas participan principalmente los TLRs intracelulares o endocíticos: TLR3, TLR7/8 y TLR9. En los apartados anteriores hemos descrito que los TLRs inician una cascada de activación del factor NF- κ B y de factores reguladores de interferones (IRF3 e IRF7) que estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias e IFNs de tipo I. En particular, estos interferones de tipo I juegan un papel primordial en la eliminación de los virus (Akira *et al.*, 2001). Por otra parte, esta activación también induce la maduración de las CD, la activación de células NK, y a la activación de la respuesta inmune adaptativa con la producción de anticuerpos y la diferenciación de linfocitos T específicos (Akira *et al.*, 2001, Bulfone-Paus, 2004) (Figura 6).

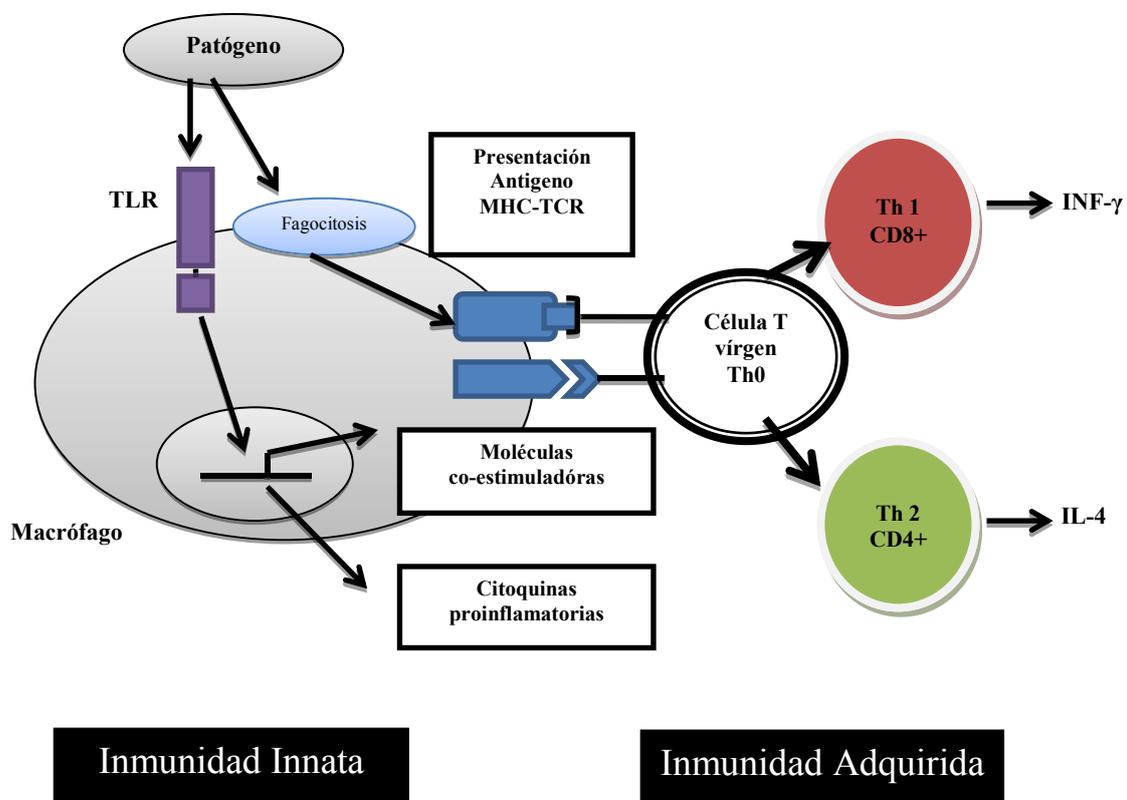


Figura 6. Interacción entre inmunidad innata y adquirida. Las células presentadoras de antígeno (macrófago o célula dendrítica) fagocitan o endocitan al patógeno, lo procesan en péptidos y lo presentan a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) al receptor TCR de las células T vírgenes (células que no han sufrido todavía el reconocimiento del antígeno). Por otra vía, los TLRs reconocen patrones de terminados del patógeno que estimulan la liberación de moléculas co-estimuladoras y citoquinas proinflamatorias. La expresión de estas moléculas co-estimuladoras junto con el proceso de reconocimiento del MHC iniciado por la fagocitosis, se desarrolla la inmunidad adaptativa "antígeno-específica", que en el caso de infecciones víricas se polariza hacia una respuesta citotóxica o de linfocitos CD8+ (tipo Th1) con la liberación final de sustancias antivirales como el IFN-gamma (Esquema modificado de Takeda y Akira, 2005).

Introducción

Uno de los primeros éxitos de la investigación sobre la interacción de los TLRs con los agentes víricos data del año 2000 cuando se descubrió que la interacción de la proteína de fusión del virus respiratorio sincitial (VRS) con el TLR4 estimulaba la producción de IL-6 en macrófagos de ratones (Kurt-Jones *et al.*, 2000). En el año 2001, Alexopoulou *et al* identificaron el TLR3 como el PRR para el RNA vírico de doble cadena (dsRNA) puesto que vieron que los ratones deficientes en TLR3 no eran capaces de responder a estos dsRNA (Alexopoulou *et al.*, 2001). La mayoría de los virus producen dsRNA durante su replicación e inducen la síntesis de INFs de tipo I (INF- α/β) mediante la vía de activación del factor NF- κ B. Por ello se ha demostrado que el TLR3 puede tener un papel importante y específico en la respuesta antiviral frente a ciertos virus (Schroder y Bowie, 2005; Vercammen *et al.*, 2008; Quintana-Murci *et al.*, 2007) como ahora el virus de Influenza A, virus respiratorio sincitial, o el virus de la encéfalo-miocarditis.

Por otra parte, TLR7 y TLR8 reconocen pequeños componentes antivirales sintéticos como las imidazoquinolinas (Hemmi *et al.*, 2002; Sioud, 2006), loxoribinas y bropiriminas, que tienen capacidad antiviral debido a que inducen la producción de citoquinas proinflamatorias, en especial INF- α (Takeda, 2003; Hemmi *et al.*, 2002). Asimismo, se ha descrito que el TLR7 puede reconocer RNA de cadena simple (ssRNA) con concentraciones elevadas de guanosina y uridina (Heil *et al.*, 2004). Como ejemplos de virus que son procesados vía TLR7 e inducen la secreción de IFN- α pueden citarse: el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la Influenza A (Heil *et al.*, 2004; Diebold *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Bowie, 2007).

Finalmente, TLR9 es esencial para el reconocimiento de oligodeoxinucleótidos con motivos CpG no metilados (CpG-ODN) en el DNA de microorganismos incluyendo bacterias, protozoos (Krieg, 2002) y virus tales como el herpes simplex. Esta activación del TLR9 produce la inducción de INF tipo I en las pDC (Lund *et al.*, 2003; Krug *et al.*, 2004). Otros DNA de invertebrados también contienen motivos CpG no metilados y son potentes mitógenos de linfocitos B, muy probablemente porque estas células también expresan TLR9. El DNA de los mamíferos se caracteriza por tener una baja frecuencia de CpG-ODN y la mayoría de ellos están metilados, haciéndolos incapaces de inducir respuestas inmunitarias. Este efecto diferencial del TLR9, explicaría la capacidad del sistema inmunitario de los mamíferos de activarse ante la presencia de DNA microbiano, pero no hacia la presencia del DNA del propio organismo.

Introducción

La actividad antivírica de los TLRs no es exclusiva de los TLRs endocíticos. Por ejemplo, la expresión de TLR4 en el tejido linfóide nasal puede verse incrementada durante la infección por el virus de la fiebre aftosa en el ganado vacuno (Zhang *et al.*, 2006), en infecciones producidas por el virus de la Hepatitis C donde también se observa un aumento de IFN- β e IL-6 en las células B infectadas (Machida *et al.*, 2006) y en infecciones por rotavirus (Xu *et al.*, 2006).

Los microorganismos generan a su vez mecanismos propios para evadir la respuesta del sistema inmune. Los estudios realizados en los últimos años explican claramente cómo algunos virus pueden evadir la respuesta del sistema inmune en el momento de su introducción en el organismo hospedador. El virus puede actuar bloqueando su reconocimiento por parte del sistema inmune o bien regulando la cascada de señalización de la célula del huésped a su favor. Como resultado de esta interacción algunos virus pueden activar algunos de los PRR para desencadenar una respuesta inmune errónea o deficiente, con un resultado positivo para su supervivencia en el organismo al que invaden. Por ejemplo el virus de la Influenza A, el virus de la rabia o el de West Nile evaden al sistema inmune bloqueando la estimulación del TLR3 (Edelmann *et al.*, 2004; Tabeta *et al.*, 2004).

1.3. Infección por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

1.3.1. Importancia del síndrome reproductivo y respiratorio porcino

Desde mediados de la década de 1980 (Keffaber, 1989), los clínicos de porcino de los Estados Unidos comenzaron a observar brotes de una nueva enfermedad que se caracterizaba por oleadas de abortos en el último tercio de gestación, aumento de los nacidos muertos y mortalidad neonatal, así como de problemas respiratorios graves en lechones de transición y engorde. Posteriormente, casos similares empezaron a producirse en Europa constituyendo lo que se denominó como “la enfermedad misteriosa de los cerdos” o “enfermedad de la oreja azul” (Lindhaus y Lindhaus, 1991; Pol *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991). Actualmente a esta enfermedad se la conoce con el nombre de síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS, *porcine reproductive and respiratory syndrome* en inglés).

Introducción

El PRRS está producido por un virus RNA del Orden *Nidovirales*, Familia *Arteriviridae*, género *Arterivirus* denominado virus del PRRS (PRRSV) (Meulenber *et al.*, 1995a, 1995b; Cavanagh, 1997; Dea *et al.*, 2000; Therrien *et al.*, 2000) (Tabla 5). El PRRSV se aisló por primera vez en 1991 por investigadores holandeses en una línea de cultivo de macrófagos alveolares porcino (PAM, *porcine alveolar macrophages*) (Wensvoort *et al.*, 1991) que son consideradas las principales células diana del virus. En la década de 1990 esta enfermedad se había diseminado ya en la mayoría de los países del mundo con una industria porcina desarrollada (Christianson *et al.*, 1993; Rossow, 1998).

Tabla 5. Clasificación taxonómica del PRRSV.

<i>Arterivirus</i>	
Clasificación vírica	
Grupo:	Grupo IV (+) ssRNA
Orden:	<i>Nidovirales</i>
Familia:	<i>Arteriviridae</i>
Género:	<i>Arterivirus</i>
Especies:	Virus de la Arteritis Infecciosa Equina Virus de la Lactato deshidrogenasa del ratón Virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino Virus de la Fiebre Hemorrágica del Simio

1.3.2. Estructura y organización genómica del virus PRRS

El genoma del virus está formado por una cadena sencilla de RNA de 15 Kb aproximadamente y de polaridad positiva (Meulenber *et al.*, 1993; Conzelmann *et al.*, 1993). El genoma vírico contiene nueve tramas de lectura abierta (ORFs – *open reading frames*) (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenber *et al.*, 1993; Allende *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2000) que codifican para 14 proteínas no estructurales (ORF1) y 8 estructurales (ORFs 2-7). La ORF1a y la ORF1b codifican la polimerasa vírica y las proteínas no estructurales (nsp1-12) (Fang y Snijder, 2010). Las ORF 2, 3, 4 y 5 codifican para proteínas asociadas al virión y a la envoltura vírica (nombradas como GP2, E, GP3, GP4 y GP%, respectivamente). La ORF6 y la ORF7 codifican la proteína de membrana (M) y la de la nucleocápside (N) respectivamente (Meulenber *et al.*, 1995a, 1995b; Snijder y Meulenber, 1998; Wu *et al.*, 2005) (Tabla 6).

Introducción

Tabla 6. Esquema de las proteínas codificadas por las distintas ORFs del PRRSV.

GEN	PROTEÍNAS	FUNCIÓN/LOCALIZACIÓN
ORF 1a/b	No estructurales	
	(nsp1-12;	Replicación vírica
	incluye nsp1 α y 1 β y nsp 7 α y 7 β)	No estructurales
	Polimerasa vírica	
ORF 2a/b, 3, 4, 5	GP2, E, GP3, GP4, GP5, pORF5a	Envuelta
ORF 6	Proteína M	Matriz
ORF 7	Proteína N	Nucleocápside

1.3.3. Diversidad genética y antigénica del PRRSV

Una de las características principales de este virus es su gran variabilidad genética y antigénica (Suárez *et al.*, 1996; Indik *et al.*, 2000; Forsberg *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 2003; Mateu *et al.*, 2003; Stadjek *et al.*, 2002 y 2006, Darwich *et al.*, 2011). Se describen dos genotipos del virus: genotipo I (anteriormente denominado europeo) cuya cepa prototipo es el virus de Lelystad, y el genotipo II cuya cepa de referencia es la VR-2332 - (Nelsen *et al.*, 1999; Kleiboeker *et al.*, 2005; King *et al.*, 2011). La secuencia de aminoácidos entre estos dos genotipos sólo presenta una homología del 55% (Murtaugh *et al.*, 1995) [Figura 7].

Dentro de cada genotipo se describen distintos subgenotipos. Así, en el genotipo europeo existen cuatro subgenotipos (1, 2, 3, 4) (Stadejek *et al.*, 2002, 2006, 2008). En la mayoría de países de la Unión Europea circulan básicamente cepas del subgenotipo 1 mientras que en Rusia y otros países de Europa del Este se detectan también los subgenotipos 2 a 4. Esta elevada diversidad genética también se puede encontrar entre cepas de un subtipo (Forsberg *et al.*, 2002; Indik *et al.*, 2000; Mateu *et al.*, 2003; Pesch *et al.*, 2005).

Introducción

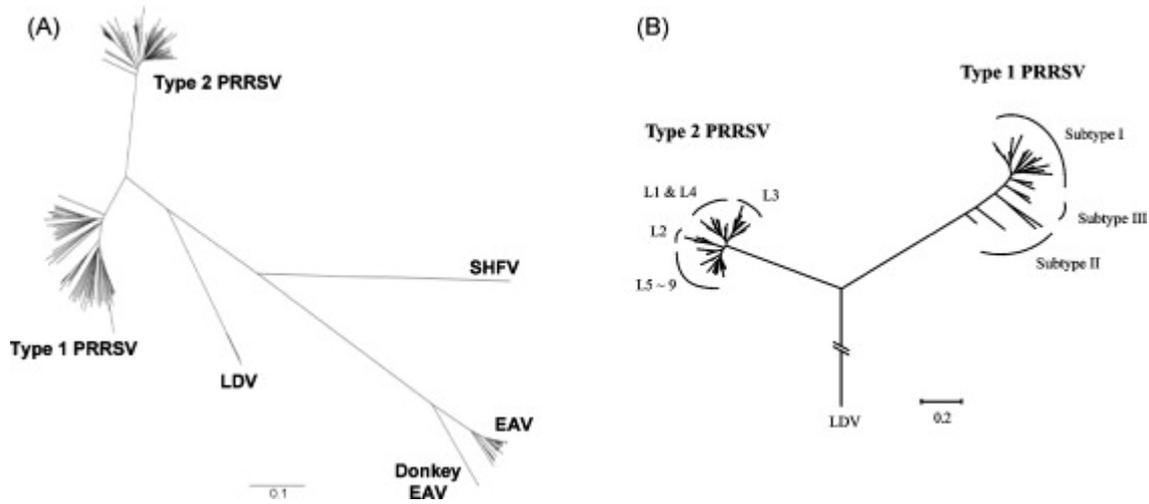


Figura 7. Árbol filogenético de la proteína mayor de la envuelta (ORF5). Extraído de Murtaugh *et al.* (2010). Las secuencias de nucleótidos fueron extraídas del Genbank para PRRSV ($n = 130$), LDV (Lactate dehydrogenase-elevating virus, $n = 2$), EAV (Equine arteritis virus, $n = 20$), donkey EAV ($n = 2$), and SHFV (Simian Hemorrhagic Fever Virus, $n = 1$). La unidad de la escala representa “sustituciones por lugar” o unidad de distancia genética estimada.

En cuanto a la diversidad genética de las cepas de genotipo II, se han descrito asimismo distinto subgenotipos aunque la clasificación no parece tan clara como en las cepas de genotipo I. Así, algunos autores examinando la diversidad genética en China hablan de la existencia dos líneas evolutivas del virus (An *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009, Yin *et al.*, 2012) mientras que otros autores proponen la existencia de hasta seis distintos subgrupos en el genotipo II (An *et al.*, 2011; Hao *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2008).

La diversidad genética del PRRSV se puede explicar por el modo de replicación del virus que depende de una RNA polimerasa sin capacidad de corrección de errores, de tal modo que la tasa mutacional se calcula en el orden de alrededor de 10^{-3} por sitio y año (Dea *et al.*, 1996; Halbur *et al.*, 1996; Kapur V *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 2000; Wootton *et al.*, 2000; Hanada *et al.*, 2005; Forsberg *et al.*, 2005; Mateu. *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2010). Asimismo, se supone que para el PRRS se produce también el fenómeno de generación de quasispecies (Goldberg *et al.*; 2003; Rowland *et al.*, 1999; Schommer *et al.*, 2006).

Otro mecanismo por el cual se puede explicar esta gran variabilidad podría ser la recombinación de material genético entre cepas, sobre todo del mismo genotipo (Darwich *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.* 2011; Murtaugh *et al.*, 2001; Van Vugt *et al.*, 2001).

Introducción

Dentro del genoma, la variación genética se distribuye de forma desigual. En un estudio reciente (Darwich *et al.*, 2011) se describe que en las cepas de genotipo I, la parte más variable del genoma corresponde a la porción de la ORF1a que codifica para las proteínas no estructurales (nsp) 1 y nsp2, seguidas por la ORF3, ORF4 y ORF5. Las zonas correspondientes a las nsp 8, 9 y 11 son las partes más conservadas del genoma. Las nsp 1 y 2 están involucradas en la regulación de la respuesta de interferones de tipo 1 y de TNF α y se ha postulado que deleciones o modificaciones en ellas podrían guardar relación con la expresión o no de estas citoquinas en respuesta al virus (Chen *et al.*, 2010; Beura *et al.*, 2010; Darwich *et al.*, 2011). Esto parece particularmente claro para el TNF- α (Chen *et al.*, 2010). Finalmente encontramos que la región más conservada del genoma vírico entre genotipos es la ORF7 que codifica para la nucleocápside (Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2011).

La diversidad genética se traduce en una serie de variaciones antigénicas que no se conocen de forma suficientemente exhaustiva. Distintos autores han reflexionado sobre las posibles repercusiones que podría tener esta elevada variabilidad genética en la interacción entre el huésped y el virus. Se cree que estas variaciones genómicas se podrían traducir en distintos puntos: en una mejor adaptación del virus a la célula diana, un incremento o disminución de la virulencia de las cepas, un enmascaramiento de los epítomos neutralizantes (Murtaugh *et al.*, 2002), una menor susceptibilidad a la neutralización (Ostrowski *et al.*, 2002) y, en definitiva, una menor eficacia de las vacunas actuales.

En primer lugar puede hablarse de una diversidad antigénica resultante de las diferencias entre ambos genotipos del virus. Al respecto, se sabe que existen epítomos comunes entre ambos genotipos; prueba de ello es la posibilidad de realizar un diagnóstico serológico de ambos genotipos utilizando la proteína N aunque existen en esta misma proteína otros epítomos que parecen específicos de genotipo (Nelson *et al.*, 1993).

En la misma línea, diferentes estudios mostraron que anticuerpos monoclonales contra las proteínas N o M de cepas americanas del PRRSV no reconocían igualmente las proteínas correspondientes a los virus europeos (Dea *et al.*, 1996; Drew *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1997). La existencia de epítomos propios de cada genotipose ha podido constatar también en otras proteínas como la GP3 (Katz *et al.*, 1995), la GP4 (Zhang *et al.*, 1998) o la GP5 (Pirzadeh *et al.*, 1997, 1998).

Introducción

Estudios recientes (Darwich *et al.*, 2011) muestran que dentro del genotipo, pueden existir enormes variaciones en las regiones correspondientes a los epítomos lineales (de neutralización o no) conocidos, hasta el punto que algunos de ellos (por ejemplo, en la GP4).

A parte de la variabilidad antigénica entre genotipos también existe una variabilidad importante dentro de un mismo genotipo. Por ejemplo, Delputte *et al.* (2004) describieron que los anticuerpos neutralizantes que se generaban frente a una cepa de PRRSV mostraban menor afinidad contra otras cepas del mismo genotipo. Numerosos trabajos de desafío con animales han demostrado que la respuesta inmune que se genera frente a una cepa confiere una protección homóloga (frente a desafíos con esa misma cepa) que es significativamente superior a una protección heteróloga (frente a desafíos con una cepa diferente aunque sea del mismo genotipo) (Karniyuchuk *et al.*, 2010; Vanhee *et al.*, 2010, Labarque *et al.*, 2004). Pero existe cierta controversia por parte de los resultados obtenidos por otros autores (Kim *et al.*, 2007; Martínez-Lobo *et al.*, 2011) donde la protección cruzada entre cepas parece no seguir este patrón de protección homólogo-heterólogo, consiguiendo unos niveles de anticuerpos neutralizantes muy bajos o nulos con cepas muy parecidas o incluso la misma cepa del desafío.

En resumen, la variabilidad genética parece traducirse en una variabilidad antigénica que podría tener importancia en la inmunopatogenia y en la protección frente al virus.

1.3.4. Células diana del PRRSV

La célula diana del PRRSV es el macrófago alveolar de pulmones (Duan *et al.* 1997a, 1997b; Wensvoort *et al.*, 1991). De todos modos, se ha descrito que el virus se puede replicar en otras poblaciones celulares como las CDs (Wang *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). El PRRSV también se replica en la línea celular de riñón de mono africano verde MA-104 y en sus derivados CL2621, y MARC-145 (Gravell *et al.*, 1986; Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993).

Actualmente se sabe que la susceptibilidad de una célula para ser infectada y replicar al virus del PRRSV depende de distintos receptores celulares. En los macrófagos, el virus se une a las moléculas de heparansulfato mediante uniones de baja afinidad con el heterodímero formado por la proteína M y la GP5 (Delputte *et al.*, 2002, 2005). Esto le permite acumularse en la superficie celular. La entrada del virus en la célula se realiza por la unión de residuos de

Introducción

ácido siálico en la GP5 vírica con la sialoadhesina (CD169) (Delputte *et al.*, 2007). En las células MARC-145 carecen de sialoadhesina y en ellas se supone que la entrada del virus está mediada por la vimentina (Kim *et al.*, 2007). La internalización final del virus y su decapsidación se realiza por interacción con CD163, un receptor scavenger (Calvert *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). La expresión de ambos receptores sialoadhesina y CD163 hace que las células sean más receptivas al virus (Van Gorp *et al.*, 2008). La unión del virus con el CD163 se realiza mediante la GP2 y la GP4 del virus (Das *et al.*, 2010).

1.3.4.1. Replicación del PRRSV

Después de entrar a la célula diana por la vía endocítica el virus empieza su ciclo de replicación que tarda de 9 a 12 horas (Pol *et al.*, 1997). En concreto, el ciclo empieza por la expresión de la replicasa vírica que se encarga de multiplicar el RNA vírico. La replicasa es una poliproteína que se segmenta en el proceso de replicación en diferentes proteínas no estructurales (nsp). Se ha demostrado que estas proteínas no estructurales intervienen tanto en la regulación de la respuesta de interferones o TNF- α (Chen *et al.*, 2010; Beura *et al.*, 2010) así como en la regulación del ciclo replicativo. Estos aspectos han sido recientemente revisados por Fang y Snijder (2010). En el curso del ciclo replicativo se transcriben varios mRNA subgenómicos que sirven para la síntesis directa de las proteínas estructurales del virus (Figura 8). Después de la replicación genómica y formación de las proteínas estructurales se forman las nuevas partículas víricas y se liberan de la célula lisando la pared celular.

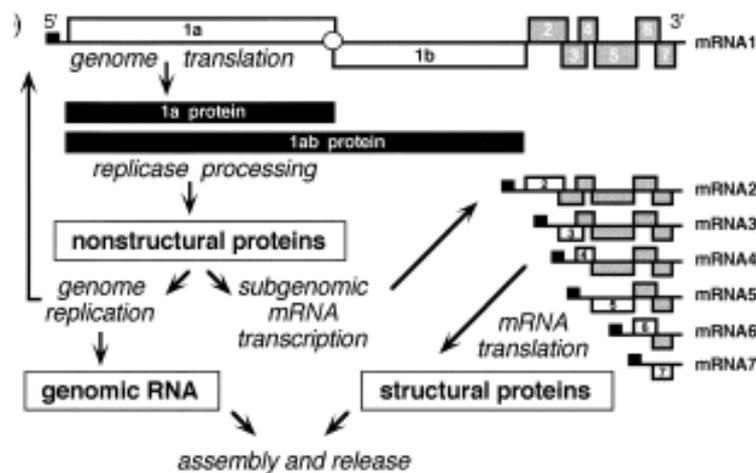


Figura 8. Ciclo de replicación de los Arterivirus (ejemplo de la EAV). Esquema extraído de Snijder E.J. 1998.

A su vez, se ha descrito que la replicación vírica puede inducir apoptosis (Costers *et al.*, 2008). Esta apoptosis podría estar mediada por los TLR3 y TLR7 (Liu *et al.*, 2009).

1.3.5. PRRSV y los mecanismos de la respuesta inmune innata

La respuesta innata que se genera frente al PRRSV es en general débil, tanto en la liberación de citoquinas (IFN tipo I) como en la actividad citotóxica de las células NK (Albina *et al.*, 1998; Buddaert *et al.*, 1998, Lamontagne *et al.*, 2003; Royae *et al.*, 2004). Además, la capacidad de inducción de IFN- α puede variar en función del tipo de cepa e incluso del clon utilizado, aunque siempre a niveles de inducción muy bajos (Lee *et al.*, 2004).

Diversos estudios demuestran que los interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) pueden inhibir la replicación vírica (Albina *et al.*, 1998, Bautista y Molitor; 1999; Overend *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2011). Por otro lado, el PRRSV posee la capacidad de regular negativamente la expresión de estos IFNs evitando la translocación de NF- κ B o inhibiendo la activación del factor regulador del IFN- α , el IRF3 (Beura *et al.*, 2010). En cuanto al factor de necrosis tumoral (TNF- α) existe cierta controversia de resultados. Mientras unos trabajos postulan que el virus inhibe la producción de esta citoquina (Lopez-Fuertes *et al.*, 2000; Van Reeth *et al.*, 1999; Thanawongnuwech *et al.*, 2001; Subramaniam *et al.*, 2010), otros observan un incremento de la expresión del mRNA y de su expresión tanto en macrófagos alveolares (Ait-Ali *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2002), PBMCs (Aasted *et al.*, 2002), como en modelos *in vivo/ex vivo* (Aasted *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2010; van Gucht *et al.*, 2003).

Referente a las citoquinas pro-inflamatorias, tenemos que la infección por el PRRSV incrementa la expresión de la IL-1 (Labarque *et al.*, 2003; van Gucht *et al.*, 2003; van Reeth *et al.*, 1999) e IL-8 (Aasted *et al.*, 2002; Thanawongnuwech *et al.*, 2001), mientras que la IL-6 experimenta cambios distintos en función del estudio: incrementa para Liu *et al.* (2010), Peng *et al.* (2009), van Gucht *et al.* (2003) y disminuye para Díaz *et al.* (2005, 2006).

La IL-10 es una de las citoquinas clave de la inmunopatogenia del PRRSV. La transcripción de esta citoquina puede ser inducida por la estimulación de diferentes TLRs o puede ser estimulada por un proceso endógeno tal como la apoptosis celular. Además está descrito que la inducción de esta citoquina puede ser regulada por diferentes factores a nivel post-

Introducción

transcripcional (Sabat *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha visto que la infección por el PRRSV produce un incremento de IL-10 en los PBMC (Díaz *et al.*, 2005, 2006; Suradhat *et al.*, 2003) y las CDs (Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009). No obstante, en otros estudios, cuando se traslada la infección al modelo animal, no hay evidencias de que se produzca este incremento de IL-10 (Wang *et al.*, 2011a; Subramanian *et al.*, 2010). Asimismo, las diferencias obtenidas entre los distintos estudios sobre la inducción de esta podrían ser debidas a la cepa de PRRSV utilizada (Gimeno *et al.*, 2011).

La interacción del virus con las células presentadoras de antígeno (APCs) comporta una serie de cambios en la maduración y expresión fenotípica de los diferentes marcadores de superficie. Se ha sugerido que estos cambios podrían ser los responsables de la ineficiente respuesta inmune innata que se observa en el desarrollo de esta enfermedad y, en consecuencia, de la lenta y errática respuesta adaptativa que se establece. Wang *et al.* (2007), han observado que tras la infección con el PRRSV, las células dendríticas derivadas de monocitos disminuyen la expresión de los complejos mayores de histocompatibilidad porcino (SLA-I y SLA-II) y de los receptores CD14 (un marcador presente en monocitos y macrófagos o CDs inmaduras). En CD inmaduras derivadas de medula ósea también se ha descrito una disminución del SLA-I aparte de un incremento de las moléculas co-estimuladoras CD80/86 (Chang *et al.*, 2008, Peng *et al.*, 2009). Estos resultados serían compatibles con una capacidad de presentación de antígeno disminuida. Por otra parte, los resultados obtenidos por Gimeno *et al.* (2011) muestran que la infección por el PRRSV es capaz de disminuir la maduración de las células dendríticas aumentando y que dependiendo de la cepa de virus la expresión SLA-I y SLA-II se altera de forma diversa. También se ha descrito una muy baja expresión de CD80/86 en DC (Flores-Mendoza *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Silva-Campa *et al.*, 2009; Gimeno *et al.*, 2011). En función de todos estos resultados, la función de las APCs infectadas por el PRRSV parece verse alterada.

Así pues, la diversidad genética parece desempeñar un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune ya que se ha visto que la capacidad de inducir o inhibir la producción de distintas citoquinas (al menos para la IL-10 o el TNF- α de forma clara y quizás para IFN- α) depende de la cepa de PRRSV utilizada (Lee *et al.*, 2004; Gimeno *et al.*, 2011). A pesar de la gran cantidad de estudios que se han realizado aun no se comprende de modo correcto cómo afecta esta diversidad a la respuesta innata.

1.3.5.1. Regulación de los TLR por el PRRSV

Los TLRs juegan un papel importante en la defensa del organismo frente al virus. En concreto, los TLR3, TLR7/8 y TLR9 participan en las respuestas antivirales mediante la activación de la producción de citoquinas, como interferones de tipo I (Akira y Takeda, 2004). Los estudios realizados sobre la interacción del PRRSV con los TLRs son escasos, pero todos ellos sugieren claramente que el virus tiene la capacidad de evadir el sistema inmunitario innato cambiando a su favor la vía de señalización de activación del NF-kB e IFNs tipo I y además de que puede activar la vía NF-kB en función de la dosis infectiva (Lee y Kleiboeker., 2005). De todos modos, la información disponible sobre el papel de los TLR en la infección por PRRSV es muy escasa.

Como comentamos anteriormente, TLR3 reconoce RNA de doble cadena (ds) algunos de los cuales se producen como intermediarios que se acumulan en la célula durante el ciclo de replicación de los Nidovirales (Perlman y Netland, 2009; Van Hemert *et al.*, 2008). En consecuencia, cabe de esperar la existencia de interacciones entre TLR3 y el PRRSV. Chaung *et al.* (2010) describieron que la infección de los PAMs o DC inmaduras con el PRRSV producía una inhibición transitoria de la expresión de los TLR3 y TLR7. Sin embargo, cuando se ha examinado la expresión de TLR3 *in vivo* o *ex vivo*, los resultados sugieren todo lo contrario.

Por otra parte, Sang *et al.* (2008a) demostraron que los PAM de lechones de 2 semanas de edad con infección congénita, sufrían un aumento de la expresión de TLR3. Por su parte, Liu *et al.* (2009) describieron un incremento en la expresión de TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 y TLR8 en los tejidos linfoides de cerdos infectados por el PRRSV. Por último, Miguel *et al.* (2010) demostraron que la expresión de TLR3, TLR4 y TLR7 aumentaba en los linfonodos traqueobronquiales y en algunas áreas del cerebro de cerdos infectados experimentalmente a las 8 semanas de edad, lo que indica que la infección por el PRRSV podría también alterar el sistema inmune innato del cerebro.

Introducción

Sin embargo, el TLR3 parece ser un elemento importante en el control de la replicación viral. Sang *et al.* (2008b) y Miller *et al.* (2009) demostraron que la activación de la señalización del TLR3 mediante el uso de productos químicos o exógenos de dsRNA (poli I:C), producía una reducción de la multiplicación vírica. Cuando a las células diana se les inducía mutaciones forzadas para tener una baja expresión de TLR3, la replicación del PRRSV aumentaba (Sang *et al.*, 2008a). Asimismo, Calzada-Nova *et al.* (2010) indicó la posible interferencia del PRRSV en la señalización del TLR7 y TLR9 en CD plasmocitoides.

En definitiva, en función del estudio tenemos una gran diversidad de resultados indicándonos que el efecto que pueda tener este virus en el control o regulación de estos TLRs puede depender de múltiples factores como las características de la cepa vírica, del animal en sí (*fondo* genético, estado inmunitario, etc.), del tipo de célula examinada, etc.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta tesis doctoral se resumen en tres:

1. Estandarización de técnicas para la detección de receptores Toll-like (TLRs) endosomales (TLR3, TLR7 y TLR9) en el porcino, para la caracterización de la distribución tisular de estos receptores en distintos tejidos y órganos del cerdo.
2. Determinación de la cinética de expresión de los TLRs endosomales en los macrófagos alveolares de porcino.
3. Estudio del efecto *in vitro* de la infección con el virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) en la regulación de la expresión de los TLRs endosomales en los macrófagos alveolares porcinos.

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Animales donantes

3.1.1.1. Pruebas de infección *in vitro*

Para realizar el estudio inmunológico de la regulación de los TLRs por el virus del PRRS se utilizaron lotes de macrófagos alveolares obtenidos de pulmones de cerdos de unas 3 semanas de vida. Los animales donantes procedían de una granja de alta sanidad y eran libres de los siguientes patógenos: PRRSV (mediante RT-PCR) y circovirus porcino tipo 2 (PCV2, mediante PCR).

Para la obtención de macrófagos, los animales eran sacrificados de forma humanitaria mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. Se extraían los pulmones de forma aséptica y se procesaban en una cabina de flujo laminar siguiendo un protocolo estandarizado detallado en el punto 3.1.2.

3.1.1.2. Pruebas de Inmunohistoquímica

Para el estudio inmunohistoquímico (IHQ) se emplearon dos lotes de cuatro cerdos sanos. Los cerdos del primer lote tenían 3 semanas de edad y los del segundo lote 3 meses. Ambos lotes provenían de una granja de alta sanidad (con el mismo estatus sanitario estipulado en el apartado anterior). El segundo lote había sido vacunado según el esquema de vacunación frente a PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* a los 3 días de su llegada a las instalaciones de la granja experimental del IRTA en el Prat (Barcelona) cuando los cerdos tenían 3 semanas de vida. Los cerdos se sacrificaron humanitariamente con pentobarbital sódico intravenoso y sistemáticamente necropsiados para la obtención de los distintos órganos o tejidos.

3.1.2. Obtención de macrófagos alveolares porcinos

Los macrófagos alveolares porcinos (PAMs) se obtuvieron mediante lavado bronqueo-alveolar. Este lavado se realizaba con una solución salina tamponada (PBS) a la que se le añadió 0,625g/L de sulfato de gentamicina (Schering-Plough, USA). El líquido recuperado después del lavado se centrifugaba a $\times 300g$ a 4°C durante 15 minutos. El conteo y la viabilidad de los PAMs se realizó mediante microscopía y tinción con azul de tripano. La viabilidad de las células utilizadas fue siempre superior al 95%. Para su congelación las células se resuspendían en medio MEM Earles (Life Technologies S.A, Grand Island, NY, USA) con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO), a una concentración de 30×10^6 células/ml. Seguidamente, los viales se congelaban en nitrógeno líquido. La esterilidad de los lotes de PAMs se comprobaba mediante PCR para los siguientes patógenos: PCV2, PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, virus de la Hepatitis E y Torque Teno Virus (TTV).

Adicionalmente, se realizaron pruebas de viabilidad y se comprobó la esterilidad microbiana mediante cultivo microbiológico convencional. La morfología y aspecto de los PAMs se caracterizaba entre el 3º y 5º día de cultivo por microscopía óptica (Nikon Eclipse TS100). Se conservaban aquellos lotes con una viabilidad mayor al 95% y con esterilidad microbiológica comprobada.

3.1.3. Cepas víricas

Las cepas de PRRSV que se utilizaron para realizar todas las infecciones *in vitro* correspondían a las denominaciones 3262, 3267 más la cepa vacunal atenuada DV² (Lote A134KF02). Las cepas 3262 y 3267 provienen de muestras clínicas que se aislaron de una granja española en el año 2005 (pulmones de lechones que presentaban neumonía intersticial) y de una granja portuguesa en el año 2006 (suero de un verraco en una granja con problemas de abortos), respectivamente. Las características genéticas e inmunológicas de estas dos cepas de campo se han estudiado en diversos estudios (Gimeno *et al.*, 2011; Darwich *et al.*, 2011; Diaz *et al.*, 2012) y se resumen en la tabla 7.

²Vacuna comercializada como Porcilis®PRRS, Merck.

Material y Métodos

Tabla 7. Descripción de las cepas víricas incluidas en los estudios in vitro.

Referencia Cepas	Código Genbank	Origen (año)	País	Respuesta inductora ^a	TCID ₅₀ ^b (pv/mL)	Deleción en la nsp2 ^c
3262	JF276431	Pulmón (2005)	ES	TNF α + /IL10+	10 ^{5,1}	SI
3267	JF276435	Suero (2006)	PT	TNF α - /IL10-	10 ^{6,8}	NO

ES, España; PT, Portugal

^a Capacidad que tiene la cepa vírica de inducir estas citoquinas en cultivos de DCs y PAMs.

^b TCID₅₀, dosis mínima infectiva para infectar el 50% de los cultivo celulares (partículas víricas/mL) (datos extraídos de Gimeno *et al.*, 2011)

^c Presencia de deleción genómica de 74 aa comprendida entre la posición 280-380 de la nsp2 (Darwich *et al.*, 2011)

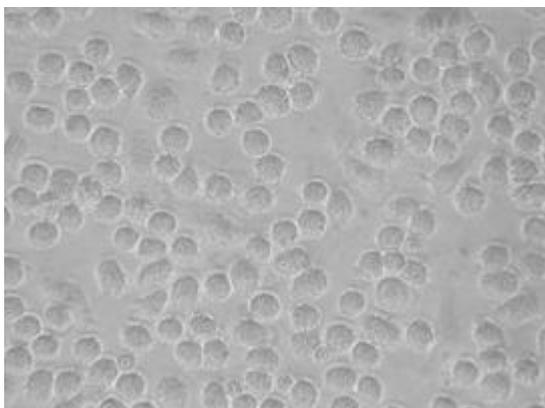
Los lotes de virus se produjeron como pase n°4 (3262) y n°6 (3267) en los PAMs. Para comprobar su similitud genética con la cepa original, los virus de los pases de trabajo eran secuenciados para la ORF5 y comparados con la cepa original. La similitud genética entre estas dos cepas es del 88,5%. Se sabe, que la cepa 3262 induce IL-10 y produce la liberación de TNF- α en las células dendríticas mientras que la cepa 3267 no es capaz de inducir la liberación de ninguna de las citoquinas mencionadas en el mismo sistema.

La titulación vírica mediante dosis infectivas de cultivo tisular 50 (TCID₅₀) se realizó en el mismo lote de macrófagos que se utilizaba para los experimentos. La titulación vírica se realizó inoculando diluciones seriadas de los lotes víricos pertinentes en los PAMs y las lecturas se realizaron mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales para la ORF5 (clon 3AH9, Ingenasa, Madrid, España) y ORF7 (clon 1CH5, Inmunología y Genética aplicada, Madrid, España) utilizando el método descrito por Reed Muench³ (1938) para el cálculo de las TCID₅₀ (partículas víricas/mL). Los lotes de cada virus se produjeron en una cantidad suficiente para permitir el uso de un único lote vírico para todos los experimentos y ensayos presentados en este trabajo.

³ Fórmula de Reed Muench para el cálculo del decimal= (% infectividad superior al 50%) – 50 / (% infectividad superior al 50%) – (% infectividad inferior al 50%)

3.1.4. Cultivo e infección *in vitro* de los PAMs.

Los PAMs una vez descongelados de forma rápida se cultivaban en placas de cultivo de 96



pocillos a una concentración 2×10^6 células/pocillo durante 18 horas antes de ser infectados con las distintas cepas del PRRSV. Se utilizó medio de cultivo MEM complementado con SFB (10%) y gentamicina (2%) [Figura 9]. Se incubaron a 37°C en una estufa con 5% CO₂ y humedad del 95%.

Figura 9. Morfología de los macrófagos alveolares porcinos en cultivo MEM suplementado con SFB (microscopio óptico 40x).

Una vez pasadas estas primeras 18 horas, los PAMs eran tratados con los estímulos pertinentes:

a) **Control negativo:** consistió en la incubación de los PAMs con el medio de cultivo estándar MEM complementado con SFB (10%, Invitrogen, Madrid, España) y de gentamicina (2%, Sigma, Madrid, España).

b) **Controles positivos:** se utilizaron moléculas estimuladoras para cada uno de los TLRs investigados:

- ✚ Ligando del TLR3: dsRNA sintético, ácido poliinosínico-policitidílico (10 µg/ml)
- ✚ Ligando del TLR7: CL097 imidazoquinolina (5 µg/ml)
- ✚ Ligando del TLR9: ODN M362 Tipo C CpG oligonucleótidos – humano/murino (10 µg/ml).

Todos estos compuestos fueron obtenidos de la casa comercial InvivoGen (Estados Unidos) y la concentración utilizada fue la recomendada en el manual de uso.

c) **Infección de los PAMs con las distintas cepas del PRRSV:**

Inicialmente se retiró el medio de cultivo de los PAMs y se procedió a lavar los pocillos dos veces con medio de cultivo libre de suero. A continuación se añadía la suspensión vírica (50 µl/pocillo) a distintas multiplicidades de infección (m.o.i.).

Material y Métodos

En concreto, se utilizaron dos moi: m.o.i.=1,0 (1 partícula vírica infectiva por cada célula diana) y m.o.i.=0,1 (1 partícula vírica infectiva por cada 10 células diana). El virus se dejaba adsorber durante 1 hora, tras la cual se retiraba el inóculo y se añadía medio de cultivo fresco como se describe en el apartado 3.1.4.a.

Los cultivos de macrófagos se realizaban en placas estériles de 96 pocillos (Cultek SL, Madrid, España). Para realizar una cinética de infección y de regulación de los TLRs se recogieron muestras a las 0, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas post-infección (PI).

3.1.5. Anticuerpos

La relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para los distintos ensayos se detalla en las siguientes tablas (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en las distintas técnicas

Especificidad	mAb/pAb (clon)	Huésped origen	Especificidad	Aplicación (Tratamiento)	Dilución	Fuente (país)
TLR3	pAb	Conejo	Humano	CMF	1:100	CliniSciences (Francia)
				WB	1:250	
				IFI	1:10	
				IHQ (EDTA)	1:250	
TLR7	pAb	Conejo	Humano	CMF	1:100	Abcam (Gran Bretaña)
				IFI	1:10	
				IHQ (sin tratar)	1:50	Abnova(Taiwan)
				WB	1:250	
TLR9	pAb	Conejo	Porcino	CMF	1:50	CosmoBio (Japón)
				IFI	1:10	
				WB	1:500	
				IHQ (EDTA)	1:250	
ORF7- PRRSV	mAb (1CH5)	Ratón	Porcino	IFI	1:20	Inmunología y genética aplicada (España)
β-Actina	mAb (AC-74)	Ratón	Porcino	WB	1:5000	Sigma-Aldrich Química (España)
TNF-α	mAb	Ratón	Porcino	ELISA	1:1000	Invitrogen (Belgium)
IL-10	mAb	Ratón	Porcino	ELISA	1:800	Invitrogen (Belgium)

mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal. CMF, citometría de flujo; IFI, inmunofluorescencia indirecta; WB, western blot; IHQ, inmunohistoquímica.

Material y Métodos

Tabla 9. Descripción de los anticuerpos secundarios conjugados con los distintos reactivos

Descripción	Huésped Origen	Conjugado	Aplicación	Dilución	Fuente (país)
Anti-IgG de conejo (Fc)	Cabra	FITC	CMF/IFI	1:100	Jackson Immuno Res (USA)
Anti- IgG2a de ratón	Cabra	FITC	IFI	1:50	Jackson Immuno Res (USA)
Anti-Ig (pAb) conejo	Conejo	PO	WB	1:3000	Abnova (Taiwan)
Control de isotipo IgG	Conejo	FITC	CMF	1:10	Abcam (Gran Bretaña)
Anti-IgG (H/L) ratón	Cabra	PO	WB	1:5000	BioNova (España)
Anti-Ig (pAb) conejo	Cabra	Biotina	IHQ	1:200	Dako (Dinamarca)
Anti-TNF-α porcino	Porcino	Biotina	ELISA	1:500	Invitrogen (Belgium)
Anti-IL-10 porcino	Porcino	Biotina	ELISA	1:8000	Invitrogen (Belgium)

mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal. CMF, citometría de flujo; IFI, inmunofluorescencia indirecta; WB, western blot; IHQ, inmunohistoquímica. FITC, fluoresceína. PO, peroxidasa.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Ensayos de Inmunohistoquímica (IQH)

3.2.1.1. Preparación de las muestras

Para esta parte del estudio se analizaron los siguientes órganos: pulmón (lóbulos apical, medio, accesorio y diafragmático) y diversos órganos linfoides como linfonodos (submandibular, traqueo-bronquial, mesentérico e inguinal), tonsila, timo y bazo.

Las muestras fueron extraídas inmediatamente después del sacrificio de los animales evitando al máximo cualquier traumatismo sobre los mismos. Las muestras se tomaron de las zonas más adyacentes para evitar posibles variaciones estructurales y para poder hacer un estudio comparativo con distintos fijadores. Una vez cortadas en pequeñas porciones (1x1 cm), las muestras se sumergían directamente en los distintos fijadores del estudio.

3.2.1.2. Sistemas de fijación de los tejidos

Las sustancias fijadoras utilizadas fueron: formol tamponado al 10% y solución de Bouin (ANORSA, España). La duración de fijación fue de 24 horas para el formol y 18 horas para el Bouin. La temperatura de fijación osciló entre 22 y 25°C. Una vez acabada la fase de fijación, las muestras se lavaban en etanol al 80%.

3.2.1.3. Inclusión en bloques de parafina

Después de la fijación y del lavado, las muestras se introducían en casetes de plástico para ser incluidas en parafina. La inclusión en parafina se realizó utilizando el equipo LEICA TP 1020 (V2.0) usando un medio de inclusión con un punto de fusión de 55-57°C. Una vez preparados los bloques en parafina se cortaban en un microtomo rotatorio LEICA RM 2255. El espesor de los cortes fue de 3-4 µm. Se realizaron cortes seriados que seguidamente eran sometidos a 37°C en un baño maría para que se estirasen. A partir de este punto los cortes se situaban sobre portaobjetos desengrasados y secados en una estufa a 37°C al menos durante 12 horas.

3.2.1.4. Tratamiento enzimático

Los cortes de tejido primeramente se desparafinaban e hidrataban siguiendo los pasos del tratamiento con xilol y la batería de alcoholes a distintas purezas 100%, 96%, 70% y 50%. Seguidamente se sometía a los cortes a un proceso de inhibición de la peroxidasa endógena (3% en metanol durante 30 min y en agitación constante). Para demostrar la especificidad del marcaje intracelular de los TLRs de los tejidos, se probaron inicialmente diferentes tratamientos enzimáticos de digestión con:

- Proteasa (0,1%)
- Tampón Citrato
- Tratamiento por EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
- Sin tratamiento

El mejor resultado de marcaje se consiguió con el tratamiento con EDTA. Por consiguiente el método enzimático de digestión y desenmascaramiento de antígeno que se utilizó para todas las muestras fue el EDTA preparado en agua destilada (0,372 g/L). Los pasos para la digestión se detallan a continuación:

1. Baño maría a 98°C durante 20 min
2. Enfriar las secciones a T° ambiente durante 30 min
3. Lavar con agua destilada

Por cada 400 ml de solución de EDTA se podían procesar 35 preparaciones de tejidos.

3.2.1.5. Marcaje IHQ

Antes de proceder al marcaje IHQ, los cortes de tejidos se bloqueaban mediante BSA (albúmina sérica bovina) al 2% durante una hora para evitar un marcaje inespecífico. Después de una serie de lavados con PBS, los cortes se incubaban con los anticuerpos policlonales de conejo para el TLR9 (THU-A-TLR9; Cosmo Bio Co., LTD, Japón), TLR3 (IMG-6315A; CliniSciences, Francia) y el TLR7 (Abcam, Gran Bretaña) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente y tras ser lavados con PBS, las secciones de tejido se incubaban con el anticuerpo secundario Anti-Ig de conejo (Dako, Dinamarca) durante 1 h a temperatura ambiente y durante otra hora más se incubaban con el kit de peroxidasa *Peroxidase Staining Kit ABC* (Thermo Scientific, Estados Unidos).

El revelado se realizaba mediante el reactivo DAB (3,3'-diaminobenzidine Tetra, Sigma-Aldrich Química, España) (0,1 g/200 ml de agua destilada) + 100 µl de agua oxigenada. El revelado se controlaba mediante inspección visual por el microscopio y las secciones se contrastaban con hematoxilina/eosina durante 5 seg.

Como controles de marcaje inespecífico se utilizaron: la incubación directa con el anticuerpo secundario sin haber añadido previamente el anticuerpo primario y controles con sueros generales (dilución 1:500) de conejo y con un control de isotipo de conejo *Negative Rabbit Antibody Set* (81-015, BioReliance, USA) a dilución 1:1000.

3.2.1.6. Lectura IHQ

La descripción del marcaje de los TLRs en los distintos tejidos se realizó mediante inspección visual en un microscopio óptico (Nikon Eclipse TS 100). Las fotografías se realizaron a 10x y 40x aumentos con el Fotomicroscopio Nikon Eclipse 90 y el programa Nikon ACT-1.

3.2.2. Citometría de Flujo (CMF)

La recuperación de los PAMs de los pocillos de las placas de cultivo se realizaba con tripsina (diluida en PBS a 1:25) durante 5-10 min. Las células recogidas se pasaban a tubos “*ependorfs*” para ser lavadas con PBS adicionado con un 1% de SFB (PBS-CMF) (4°C, 5 min, 1.600 rpm). Tras centrifugar y decantar el sobrenadante, las células se permeabilizaban con Tween-20 (0,2%) durante 15 min a 37°C. Después de tres lavados con PBS-CMF, se incubaban en frío con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 8) para el TLR3 (CliniSciences, Francia), TLR7 (Abcam, Gran Bretaña) y TLR9 (CosmoBio, Japón) durante 45 min. Tras otros tres lavados más, los macrófagos se incubaban con el anticuerpo secundario (Anti-IgG conejo-FITC; Jackson Immuno Res; USA) durante 25 min en frío (Tabla 9). Finalmente las células se lavaban de nuevo tres veces y se examinaban en el citómetro de flujo EPICS XL-MCL (programa Expo 32 ADC) y analizadas con el programa WinMDI-2.9.

3.2.3. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

3.2.3.1. Marcaje de los TLRs

La técnica de IFI se realizó en portaobjetos excavados. Aproximadamente 15×10^6 de células se dispensaban en estos portaobjetos. A continuación, los macrófagos se lavaban tres veces con PBS, se fijaban y permeabilizaban con metanol absoluto, durante 20 min a -20°C. Tras la fijación, los portas se lavaban de nuevo 3 veces más con PBS. Después se bloqueaban con suero de cabra (5% en PBS) 45 min a 37°C. La tinción de los TLR se realizaba mediante la incubación de los macrófagos con los anticuerpos primarios para el TLR3 (CliniSciences, Francia), TLR7 (Abcam, Gran Bretaña) y TLR9 (CosmoBio, Japón) a temperatura de 37°C durante 1 hora (Tabla 8). Después de otros 3 lavados las células se incubaban con el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (Anti- IgG conejo-FITC; Jackson Immuno Res; USA) a 37°C durante 1 hora (Tabla 9). Finalmente, se utilizó el reactivo ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Gran Bretaña) que contiene Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) como fijador celular de los portaobjetos y como colorante con afinidad para marcar el núcleo de las células fijadas.

3.2.3.2. Marcaje del PRRSV

Para el marcaje vírico mediante IFI se utilizaron placas de 96 pocillos a una concentración de células de 5×10^6 /mL. Los macrófagos se permeabilizaron con metanol absoluto a -20°C durante 1 h y el bloqueo se realizó con PBS+ 20% SFB durante 1 h. A partir de este punto se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para los TLRs pero utilizando el anticuerpo primario anti-ORF7 PRRSV (Inmunología y genética aplicada, España) (Tabla 8) y un anti-IgG2a de ratón (Jackson Immuno Res, Estados Unidos) como secundario (Tabla 9).

Las muestras fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia modelo NIKON ECLIPSE TS 100 (suplemento de fluorescencia C-SHG SERIE 0410020).

3.2.4. Western Blot (WB)

La prueba del WB fue utilizada para ver la especificidad de los anticuerpos para los TLRs no porcinos (TLR3 y TLR7). El procedimiento que se utilizó para el WB fue el siguiente: Aproximadamente 25×10^6 PAMs se trataron con solución de lisado para WB (anexo 8.2) durante 30 min en hielo. A continuación, se determinó la concentración de proteína de cada lisado mediante el método Bradford (Bradford, M. Anal. Biochem., 72:248, 1976) y se ajustó la muestra para que contuviera entre 20-25 μg de proteína. Las proteínas se separaron posteriormente mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (Life Technologies S.A., Madrid, España) y se transferían a una membrana de nitrocelulosa Amersham Hybond-ECL (VWR International Eurolab S.L.). Estas membranas se bloqueaban durante toda la noche con el agente bloqueante ECL Advance (Acefe S.A., España) preparado en PBS (pH 7,4) y a 4°C . Al día siguiente, las muestras se incubaban con los anticuerpos primarios frente a TLR3 (CliniSciences, Francia), TLR7 (Abcam, Gran Bretaña) y β -Actina (Química, España) durante 1 hora a temperatura ambiente (Tabla 8) y después de los lavados correspondientes se incubaban con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa obtenido en cabra (BioNova, España) a las mismas condiciones que el primario (Tabla 9). El revelado se realizó con el Amersham ECL Advance Western Blotting Detection kit – Lumigen TMA-6 (ACEFE S.A., España). Los resultados fueron leídos en el Multimage Light Cabinet Filter Positions con el programa Alpha Ease FC (FluorChem HD2).

3.2.5. ELISA de captura

La detección de TNF- α e IL-10 en los cultivos de PAMs infectados con las cepas 3262 y 3267 se realizó mediante ELISA a partir de los sobrenadantes de estos cultivos. Para ello los macrófagos, cultivados a una densidad de 2×10^6 células por pocillo, se infectaron con las cepas 3262 y 3267 a una m.o.i.=1.0. Tras la incubación con el virus los sobrenadantes de los cultivos se recogieron distintas horas post-inoculación y se guardaron a -80°C hasta su uso. Por su parte, las células se recogieron en Trizol® (Life Technologies) para su posterior análisis mediante PCR a tiempo real.

Las placas de ELISA se tapizaron con los anticuerpos comerciales de captura (coating Ab) anti- TNF- α y anti-IL-10 de porcino (Invitrogen, Belgium) correspondientes (Tabla 8), y se incubaron durante toda la noche (12-18 horas) a 4°C . Al día siguiente las placas se lavaban una vez con la solución de lavado (PBS + 1%Tween 20).

3.2.5.1. ELISA de IL-10

Tras el bloqueo de las placas con el tampón de bloqueo *Buffer Assay* (PBS+ 0,5%BSA+ 0,1% Tween20) durante 1 hora a temperatura ambiente se ponían las muestras en los pocillos diseñados y se incubaban durante 1 hora y 30 min a temperatura ambiente. Después se lavaban 5 veces y se incubaban con el anticuerpo de detección Anti- IL-10 porcino conjugado con Biotina (Invitrogen, Belgium).

3.2.5.2. ELISA de TNF- α

Las muestras se incubaban durante 2 h a temperatura ambiente al mismo tiempo que el anticuerpo de detección Anti- TNF- α porcino conjugado con Biotina (Tabla 9). Después de la incubación todas las placas se lavaban 5 veces con el Buffer de Lavado (Wash) y se les añadía la Solución de Streptavidina (ELISA Grade Streptavidin-HRP 1:2000 para IL-10 y 1:7500 para TNF- α). Las placas se incubaban a temperatura ambiente durante 45 y 30 min respectivamente. Otra vez eran lavadas 5 veces más e incubadas con el substrato TMB (Tetramethylbenzidina, Invitrogen, España). La reacción era detenida con la solución de Stop (1 M H_2SO_4).

3.2.5.3. Recta de calibración con los estándares

La concentración de estas citoquinas fue calculada utilizando la regresión lineal entre la absorbancia (D.O.) de los estándares a distintas diluciones seriadas y su concentración equivalente (4.000, 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62,5 $\mu\text{g/mL}$) que proporcionaba el kit comercial (Figura 10).

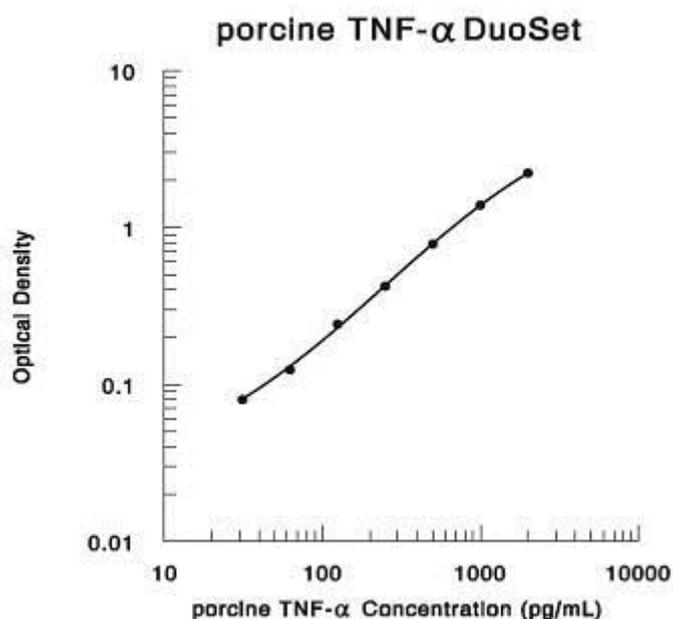


Figura 10. El gráfico representa los típicos resultados obtenidos mediante el kit porcine TNF- α DuoSet. La curva estándar ha sido calculada utilizando el programa informático 4-PL curve-fit.

3.2.6. RT-PCR a tiempo real (RT-PCR rt)

3.2.6.1. Extracción RNA

La extracción de RNA se realizó con Trizol (Life Technologies S.A., Madrid, España) siguiendo el protocolo estándar (1mL Trizol / 10^6 células). Brevemente, tras la captación del RNA con glicógeno, las muestras se trataban con cloroformo, centrifugándolas 15 min a 12.000g y a 4°C. La fase acuosa se recogía en otro tubo y allí la muestra se trataba con isopropanol durante 10 min a temperatura ambiente. Se volvía a centrifugar a 12.000 g, 4°C durante 10 min. Seguidamente, el pellet de RNA se lavaba dos veces con etanol al 75% y se resuspendía finalmente con agua libre de RNAsas (30 μl).

Material y Métodos

Para proteger la RNA de su degradación se añadía al agua libre una sustancia protectora llamada *Protector RNase Inhibitor* (RocheDiagnostics GMBH, Manheim, Alemania) en un volumen de 0,5 µl para cada muestra.

3.2.6.2. Cuantificación y calidad del RNA

La concentración de RNA se medía por el valor de la absorbancia a 260 nm y la pureza se evaluaba mediante la determinación de la ratio de absorbancias entre distintas longitudes de onda (λ) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio Calidad RNA} = \text{D.O. Absorbancia } (\lambda \text{ 260nm}) / \text{D.O Absorbancia } (\lambda=280 \text{ nm})$$

Las muestras eran consideradas como relativamente puras y adecuadas para su uso cuando el valor de la ratio era $\geq 1,8$. Finalmente la concentración de RNA se ajustaba a 20 µg/ml en todas las muestras diluyéndolas con agua libre de RNAsas junto con el *Protector RNase Inhibitor* y se guardaban a menos 80°C hasta su utilización.

3.2.6.3. Preparación de los estándares de la RT-CR rt para los TLRs

Se utilizó la β -actina como control endógeno de la prueba. Para normalizar los resultados obtenidos para cada uno de los TLRs se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = \text{Media CT}^4 \text{ TLR} / \text{Media CT de } \beta\text{-actina}$$

Los valores denominados CT (del inglés cycle threshold, cuya traducción es ciclo umbral) nos indican el número de ciclos necesarios para que la PCR rt sea capaz de detectar el producto. Estos valores son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN inicial y suelen poseer una incertidumbre sobre la medida mínima, en general inferior al 5%.

⁴ CT= Cycle Threshold

3.2.6.4. Preparación de los estándares de la RT-PCR rt para el virus

- La extracción de RNA fue realizada con el kit Viral RNA Isolation NucleoSpin RNA Virus (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 11).

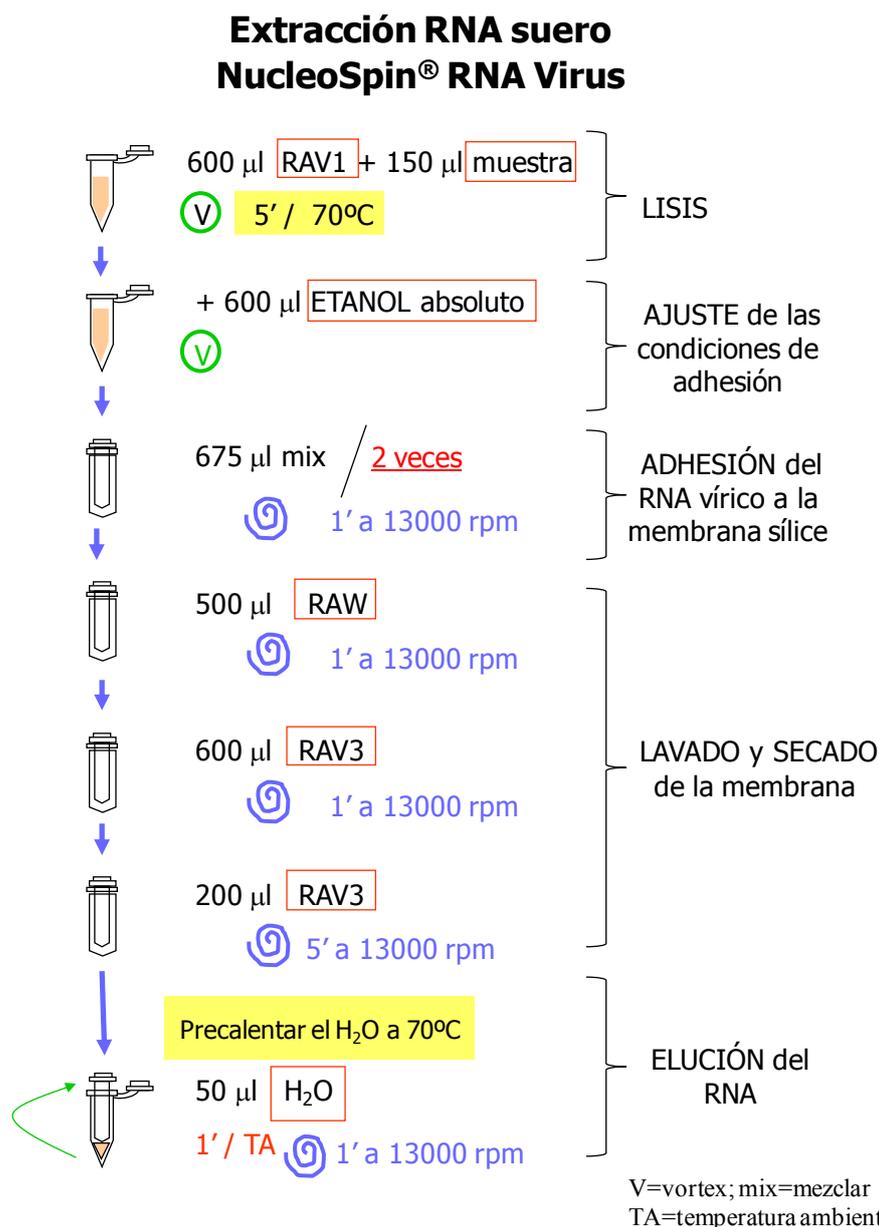


Figura 11. Esquema del proceso de extracción del RNA vírico mediante el protocolo del kit.

Material y Métodos

- *RT-PCR protocolo:*

Reactivos	1 muestra	Concentración
H ₂ O libre RNAsas	7,85 µl	-
Random Primers	0,4 µl	3 ug/ul
RNA Muestra	2,5 µl	-
Total volumen por muestra	10,75	

PROGRAMA RT-1 TERMOCICLADOR: 70°C -----10 min
4°C ----- indefinido

A continuación a los tubos de la RT1 se les añadía la siguiente mezcla hasta alcanzar un volumen final de 25 µl:

Reactivos	1 muestra	Concentración
Buffer SupII (5x)	5 µl	5x
DNTP	0,25 µl	100mM (25mM c/u)
DTT	2,5 µl	0.1 M
RNAsa OUT	0,5 µl	40 U/ul
H ₂ O libre RNAsas	5,5 µl	-
Superscrit II	0,5 µl	200 U/ul
Volumen total por muestra	14,25 µl	

PROGRAMA RT-2 TERMOCICLADOR:

42°C -----50 min
70°C -----15 min
4°C ----- indefinido

- *PCR protocolo:*

A partir de 2,5µl del final producto de la RT de cada muestra se le añadía 47,5 µl de la siguiente mezcla:

Reactivos	1 muestra	Concentración
H ₂ O	38.2 µl	-
Buffer ^a	5 µl	10x
DNTPs	0.4 µl	100 mM
MgCl ₂	1.5 µl	50 mM
Primer F	1 µl	25 uM
Primer R	1 µl	25uM
Taq DNA polimerasa (Ecotaq)	0.4 µl	5 U/ul
Volumen total por muestra	47,5 µl	

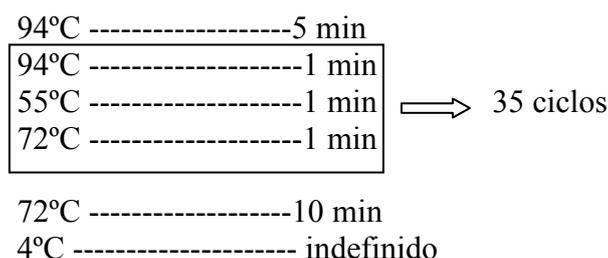
^aTris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH=8,4 a 25°C

Los primers utilizados en la PCR del virus amplifican la región codificante de la nucleoproteína (Díaz *et al.*, 2006). La secuencia de estos se detalla a continuación:

ORF7 Reverse: 5'-AATTTTCGGTCACATGGTTCC-3'
ORF7 Forward: 5'-GGCAAACGAGCTGTAAACG-3'

Material y Métodos

PROGRAMA de TERMOCICLADOR para PCR-PRRSV:



- *Purificación del cDNA vírico* producto de la PCR:
Siguiendo el protocolo descrito en el MiniElute PCR Purification Kit (50) (Qiagen GmbH) se realizó la mezcla de 5 volúmenes de Buffer PBI (del kit) con 1 volumen del producto de la PCR y se añadió a la columna de filtración. Centrifuga 1 minuto a 1200 rpm. Se añade a columna el Buffer PE → se centrifuga 1 min a 1200 rpm → se añade 10 µl de Buffer EB se deja 1 min y se vuelve a centrifugar. La alícuota se utiliza como el control de cDNA vírico en la PCR-rt.
- Para determinar la concentración y su pureza se determinaron las absorbancias a 260 y 280 nm. La pureza se determinó mediante la ratio de absorbancias a 260 y 280 nm y la concentración de cDNA se midió mediante el valor de la densidad óptica (D.O.) de la absorbancia a 260 nm (ver el apartado 3.2.6.2.). La concentración del cDNA obtenido fue de 98 µg/ml. Se hacían las alícuotas correspondientes y se guardaba a -80°C.

Una vez determinada la concentración del DNA, se calculó el número de copias del amplicón de la ORF7 presente en 1 µg de DNA purificado. Considerando la secuencia del amplicón, conocida, puesto que la cepa de origen está completamente secuenciada, se calculó su peso molecular con la ayuda de una calculadora de peso molecular para DNA disponible online (<http://www.changbioscience.com/genetics/mw.html>). A partir del peso molecular (15415 gr), y considerando que, por definición, 1 mol equivale a $6,02 \times 10^{23}$ moléculas, se calculó el número de moléculas de amplicón que se encontraban por unidad de peso o de volumen (microgramos o microlitros) del DNA purificado.

A continuación se realizó una cuantificación relativa del producto, valorando las diferencias en la expresión del gen blanco relativo a la expresión del gen normalizador. El método de CT comparativo, también llamado el método de $\Delta\Delta CT$, usa las fórmulas aritméticas para lograr un resultado para la cuantificación relativa. La ventaja de este método es que no exige curvas

Material y Métodos

estándar para cada pozo de reacción, permite el ahorro de reactivos y es útil cuando hay un número alto de blancos y/o de muestras.

La PCR cuantitativa se ajustó para un volumen de 5 μ L de DNA purificado, equivalentes a $1,3 \times 10^{10}$ copias del amplicón de DNA. A partir de ahí, se realizó una serie de diluciones en base decimal desde 10^0 hasta 10^{-12} que se probó por triplicado en la PCR. Para cada dilución se determinó el ciclo (media y desviación estándar) a la cual dicha dilución se consideraba positiva (CT); es decir, la señal fluorescente que producía era significativamente distinta del fondo ($\Delta\Delta$ CT). Finalmente, los productos amplificados a partir de una CT > 35 no se consideraron específicos. A continuación se calculó el coeficiente de correlación resultante de aparejar el \log_{10} del número de copias de amplicón añadidas a la mezcla de PCR con el valor medio de CT resultante para cada muestra.

La cuantificación de los TLRs se realizó de forma relativa a la cantidad de β -Actina que contenía cada muestra.

3.2.6.5. Transcripción reversa y amplificación del DNAmuestra por el método TaqMan

La transcripción y amplificación del RNA (5 μ l/muestra) se realizaba en un solo paso utilizando el kit comercial de PCR (TaqMan One-Step RT-PCR Master Mix, Applied Biosystems, Estados Unidos) en el equipo TaqMan (7500 Fast Real-Time PCR System). Las muestras se analizaban por duplicado y se realizaban tres réplicas de cada cultivo o estímulo. El protocolo consistía en una fase previa de precalentamiento a 50°C (30 min) y 95°C (15 min), 40 ciclos de desnaturación (94°C, 15 s) y de un periodo de alineamiento/extensión (60°C, 60 s) por ciclo.

La concentración de trabajo de los reactivos de la RT-PCRrt por muestra fue la siguiente:

	1 muestra	Concentración
H ₂ O	1.875 μ l	-
Master Mix	12.5 μ l	2x
Multistric RNAsa	0.625 μ l	40x
Sonda	0.5 μ l	10 μ M
Primer Forward	2.25 μ l	10 μ M
Primer Revers	2.25 μ l	10 μ M
Total volumen /reacción	25 μ l	

Material y Métodos

Los oligonucleótidos utilizados para la construcción de los primers y de las sondas fueron sintetizados por Roche Diagnostics, S.L. (Barcelona) y se detallan a continuación:

TLR3: Primers: 5'- GGGAAAGCTCCAGTATCTGC-3' (Forward)
5'-TGAGGCTTCTGGAACAGTTG-3' (Revers)
Sonda: 6-FAM⁵-TGGACCTCAGCTACAACCAGCTGAA-TMR-3'

TLR7: Primers: 5'-TGGCCTCTCTCTGAACAATG-3' (Forward)
5'-TCCAAAGAAAGTCGTGTTGC-3' (Reverse)
Sonda: 6-FAM-TCCCTGAGCAACATCCAGCTGTACA-TMR-3'

TLR9: Primers: 5'- GCCATTACTAGGGAGGTGGA-3' (Forward)
5'- CTTGCAGTTTGGCATGAAGT-3' (Reverse)
Sonda: 6-FAM- CCTCGCTCCACGTCCACTGG-TMR-3'

β -Actina: Primers: 5'- GGCATCCACGAAACTACCTT-3' (Forward)
5'- TGATCTCCTTCTGCATCCTG- 3' (Reverse)
Sonda: 6-FAM- CATGTACCCAGGCATCGCCG-TMR-3'

PRRSV: Primers: 5'- AGTTGCTGGGTGCAATGATA-3' (Forward)
5'- AATGTGGCTTCTCAGGCTTT-3' (Reverse)
Sonda: 6-FAM-AAGTCCCAGCGCCAGCAACC-TMR-3'

3.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico StatsDirect versión 2.7.8b utilizando la prueba de regresión lineal para la correlación entre concentraciones del control y valores de CT y la prueba de Kruskal-Wallis para determinar diferencias entre medias.

⁵ 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) Single Isomer

4. RESULTADOS

4.1. Distribución de los TLRs en tejidos de cerdo mediante inmunohistoquímica (IHQ)

La caracterización y distribución de las células positivas a los diferentes TLRs se realizó en pulmón y tejidos linfoides (linfonodos, tonsilas, timo y bazo) de cerdos sanos de 3 semanas y 3 meses de edad. Asimismo se comparó la calidad de la tinción entre dos métodos de fijación de los tejidos (formol tamponado al 10% y solución de Bouin).

4.1.1. Marcaje del TLR3.

La tinción con el anticuerpo TLR3 específico para humano pero con supuesta reactividad cruzada con el TLR3 porcino, resultó en un marcaje con un alto grado de color de fondo en la mayoría de órganos linfoides examinados y en el pulmón (Figura 12).

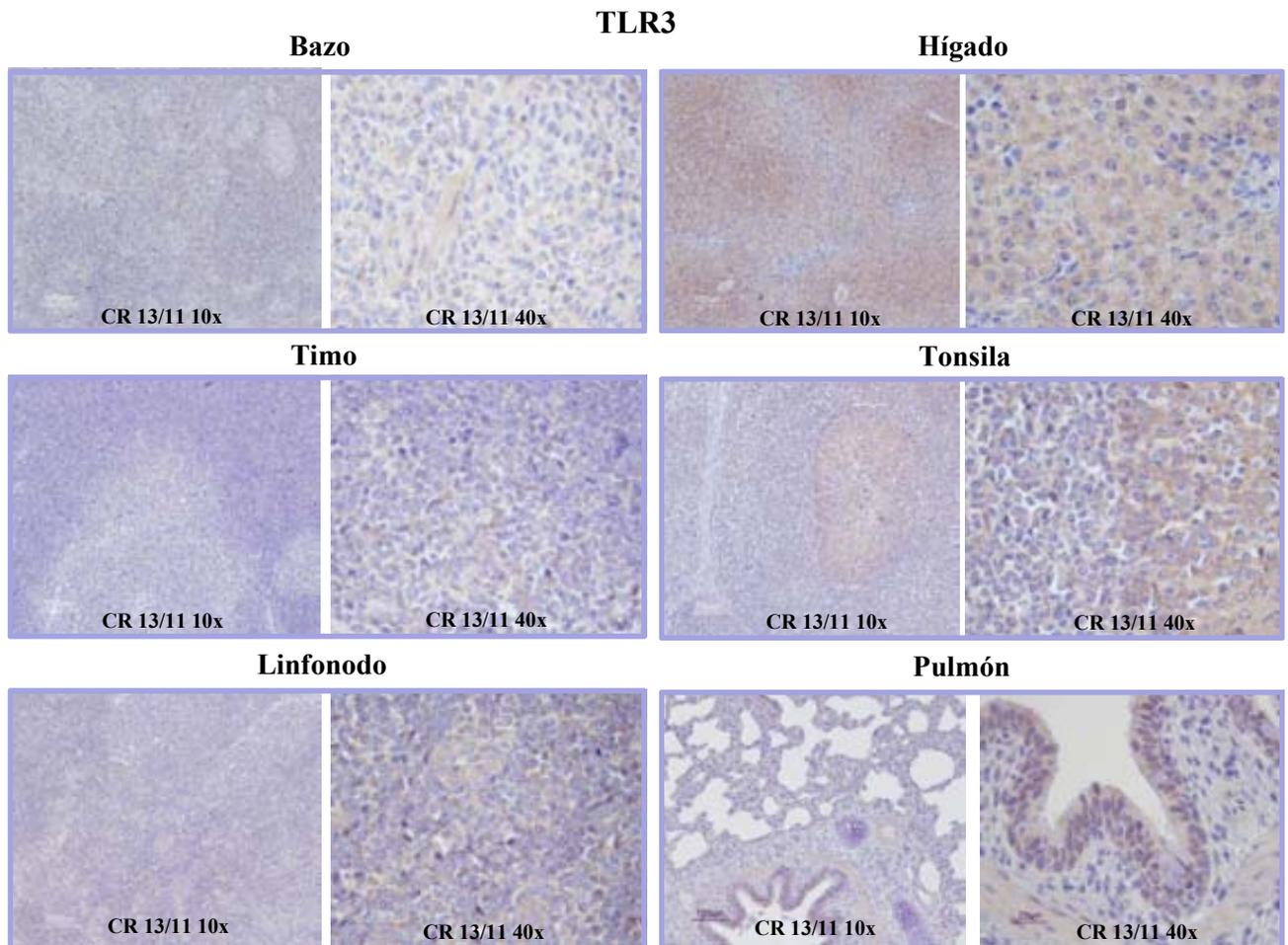


Figura 12. Expresión de TLR3 en los distintos tejidos porcinos.

Resultados

Estos resultados se repitieron a pesar del uso de distintas condiciones de tratamiento para IHQ y no se pudo llegar a eliminar este color de fondo inespecífico.

4.1.2. Marcaje del TLR7.

El marcaje por IHQ de este receptor no fue posible con el anticuerpo utilizado. Una de las posibles causas de esta falta de marcaje podría ser que el anticuerpo comercializado está estandarizado para técnicas (CMF, IFI) donde se utilizan células o tejidos frescos y no muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. El problema que tienen estas muestras no frescas es que los métodos de fijación suelen ser muy agresivos para ciertos receptores proteicos y éstos se rompen tras el proceso y no pueden ser reconocidos por el anticuerpo. Tampoco se pudo encontrar en el mercado otro anticuerpo para el TLR7 que tuviera reactividad cruzada con el porcino y funcionara con muestras de tejidos fijados.

4.1.3. Marcaje del TLR9.

El marcaje de TLR9 por IHQ resultó específico y con muy bajo color de fondo (Figuras 13a-13f). En este caso, el marcaje en los tejidos fijados en formol fue mejor que en los fijados en Bouin. De hecho, la fijación con Bouin daba lugar a diferencias importantes en los tejidos de animales de distinta edad. Así, en los cerdos de tres meses, se aprecia marcaje TLR9⁺ en células de todos los lóbulos pulmonares, en los linfonodos y en tonsilas, pero no se puede detectar marcaje en el timo, en el bazo o en las placas de Peyer. Sorprendentemente, para los animales de tres semanas de edad cuyos tejidos habían sido fijados con Bouin no se observó marcaje alguno en ninguno de los tejidos estudiados (Tabla 10). Contrariamente, la fijación con formol no presentó ninguno de estos problemas.

Resultados

Tabla 10. Distribución del marcaje inmunohistoquímico de TLR9 en distintos tejidos porcinos.

Tejidos (células)	Cerdos de 3 semanas de edad		Cerdos de 3 meses de edad	
	Formol	Bouin	Formol	Bouin
Pulmones:	+++			
Neumocitos	+++	-	+++	++
Células endoteliales	+++	-	+++	++
Células dendríticas			+++	++
Linfonodos:				
Células epiteliales	+++	-	+++	++
Células dendríticas	+++	-	+++	++
Tonsila:				
Células dendríticas	++	-	++	+
Tejido interfollicular	+++	-	+++	+
Timo:				
Células epiteliales	+	-	+	-
Bazo:				
Células reticulares	+	-	+	-
Células mio-epiteliales	+++	-	+++	-
Fibroblastos	+	-	+	-
Linfocitos	+	-	+	-
Placas de Peyer:				
Células epiteliales	+++	-	++	-
Linfocitos	++	-	++	-
Monocito/Macrófago	++	-	++	-

Marcaje IHQ: Negativo (-), Ligeramente (+), Moderado (++) , Intenso (+++)

En cualquier caso, las células más frecuentemente marcadas en todos los tejidos son las células epiteliales. Se detecta positividad de estas células para el TLR9 en los pulmones, linfonodos, timo y placas de Peyer. Además en los lóbulos pulmonares se marcan los neumocitos y las células endoteliales. En los tejidos pulmonar, linfático y tonsilar, además hay un marcaje de células alargadas y estrelladas que podrían ser compatibles con el morfotipo de célula dendrítica.

Respecto al bazo podemos decir que las células TLR9⁺ se encuentran alrededor de los vasos y con morfología compatible con las células mioepiteliales. En el conjunto de las células marcadas se incluyen células alargadas muy parecidas a fibroblastos o células reticulares. También parece ser que en el bazo y en las placas de Peyer hay marcaje de alguna célula redonda parecida a una célula linfocitaria aunque para poder discernir el tipo celular se debería recurrir a un doble marcaje con anticuerpos específicos (p.e. para CD3, IgM⁺, etc).

Resultados

Pulmón

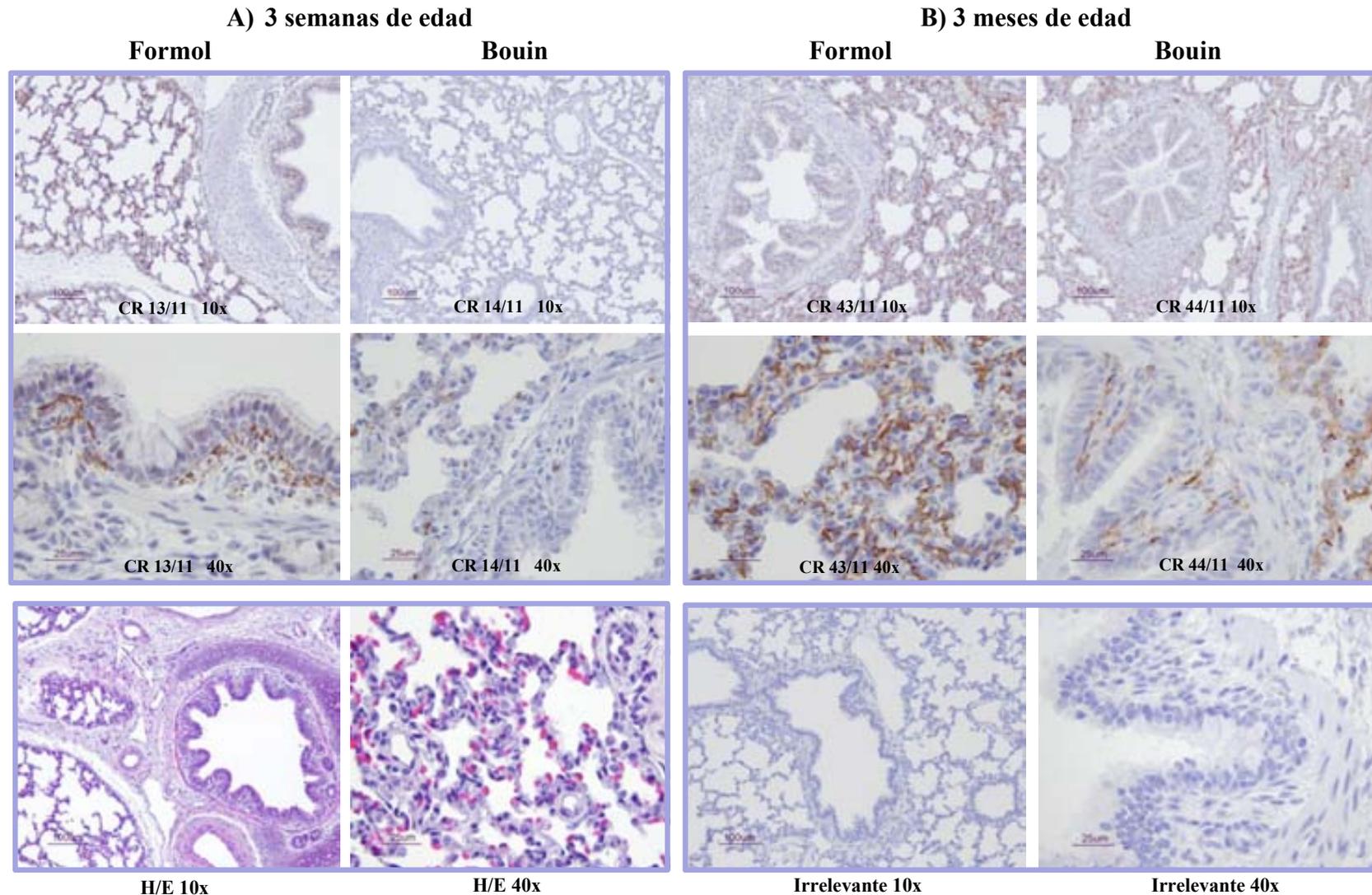


Figura 13a. Marcaje para TLR9 en cortes de tejido pulmonar. La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

Resultados

Linfonodo Mesentérico

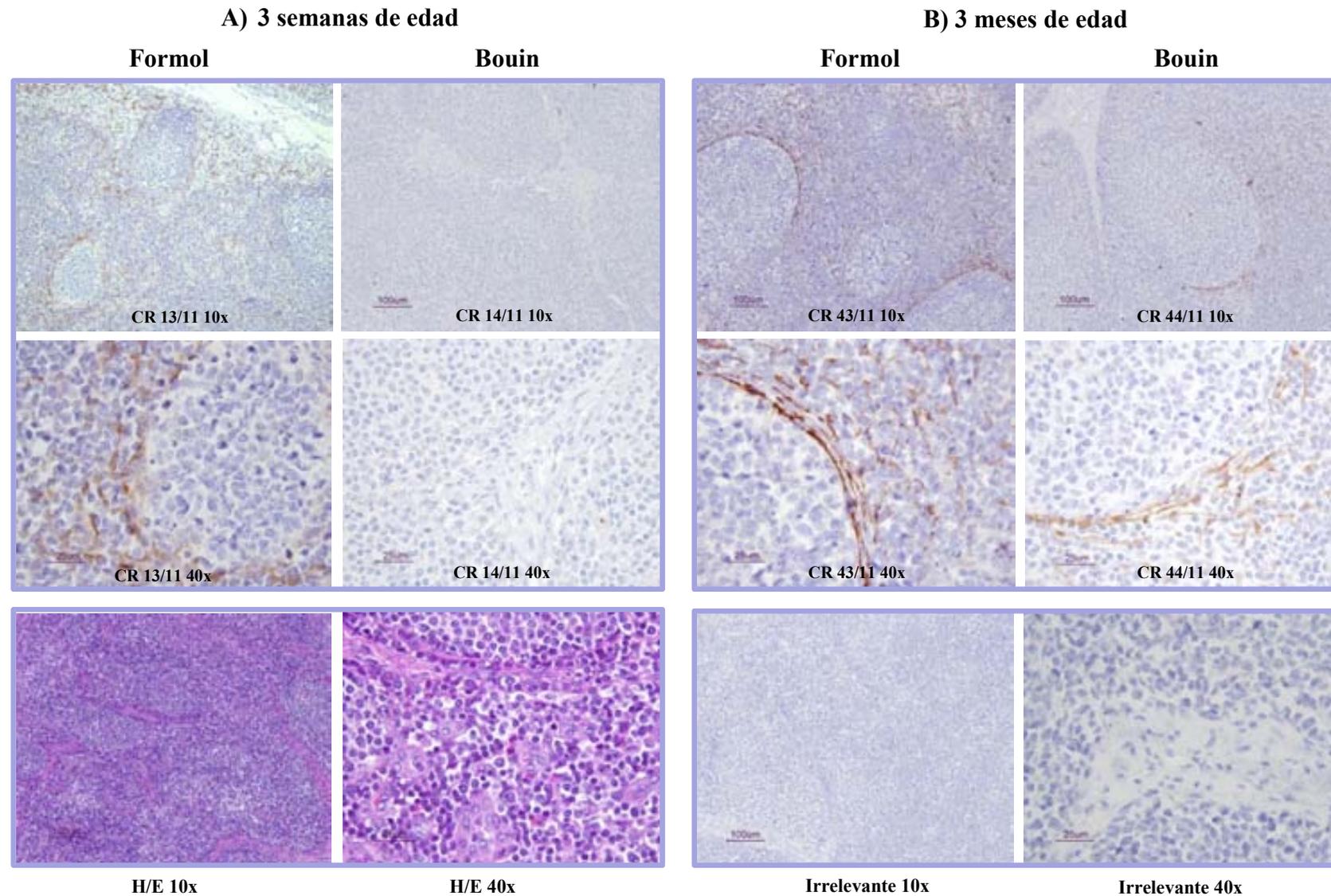


Figura 13b. Marcaje para TLR9 en cortes de linfonodo mesentérico. La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

Resultados

Tonsila

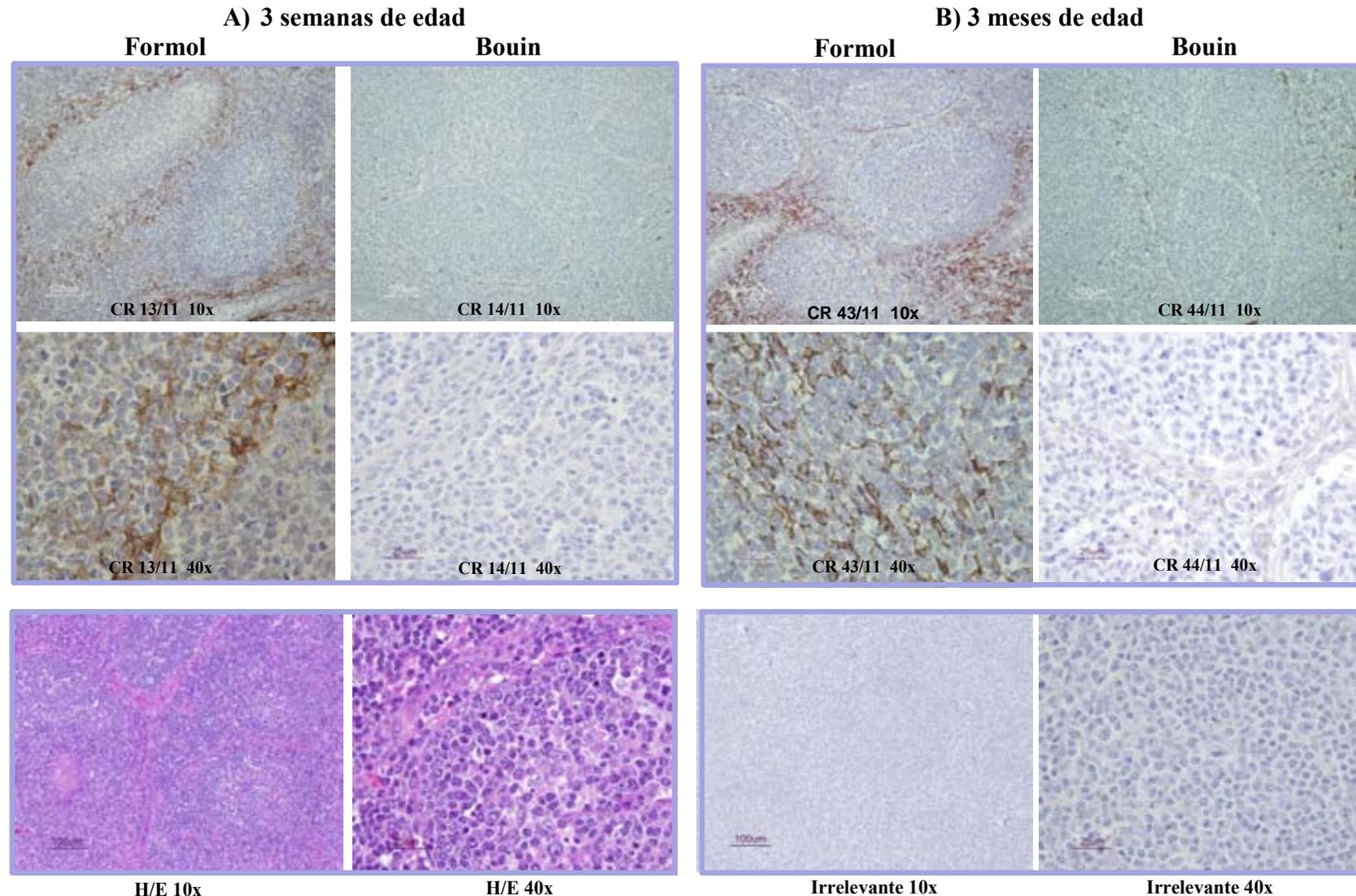


Figura 13c. Marcaje para TLR9 en cortes de tonsila. La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

Resultados

Timo

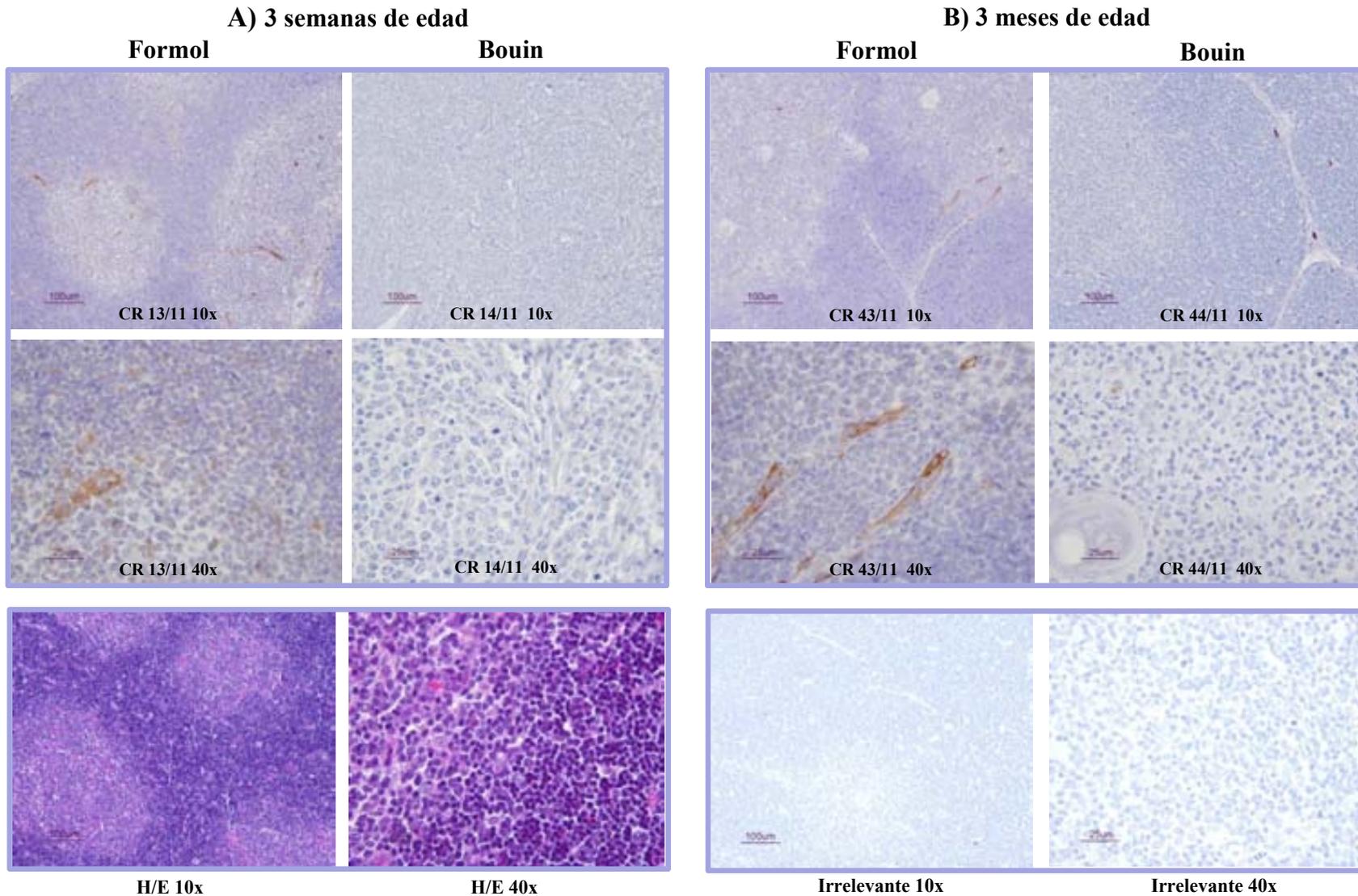


Figura 13d. Marcaje para TLR9 en cortes de timo. La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

Resultados

Bazo

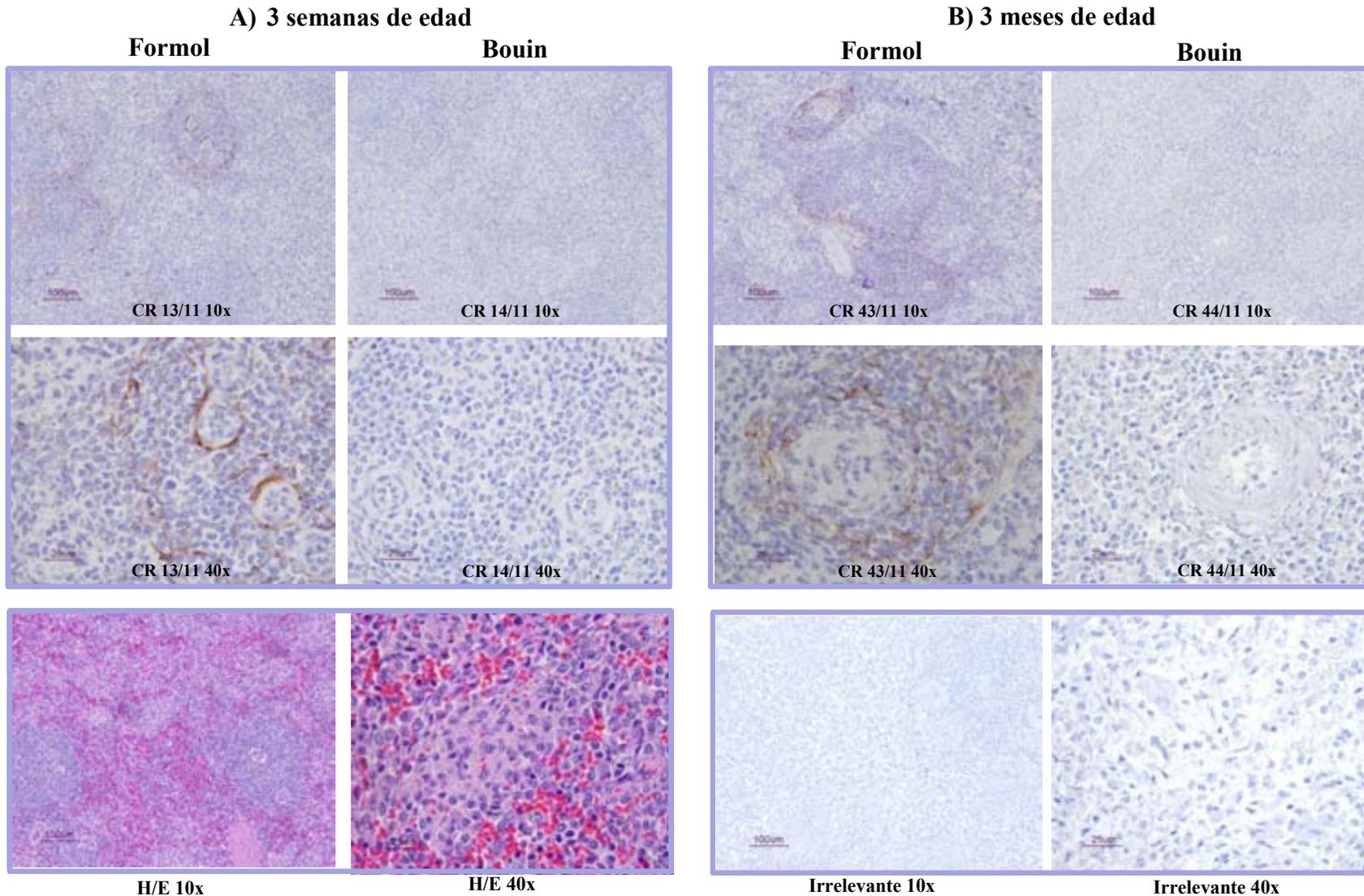


Figura 13e. Marcaje para TLR9 en cortes de bazo. La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

Resultados

Ileon

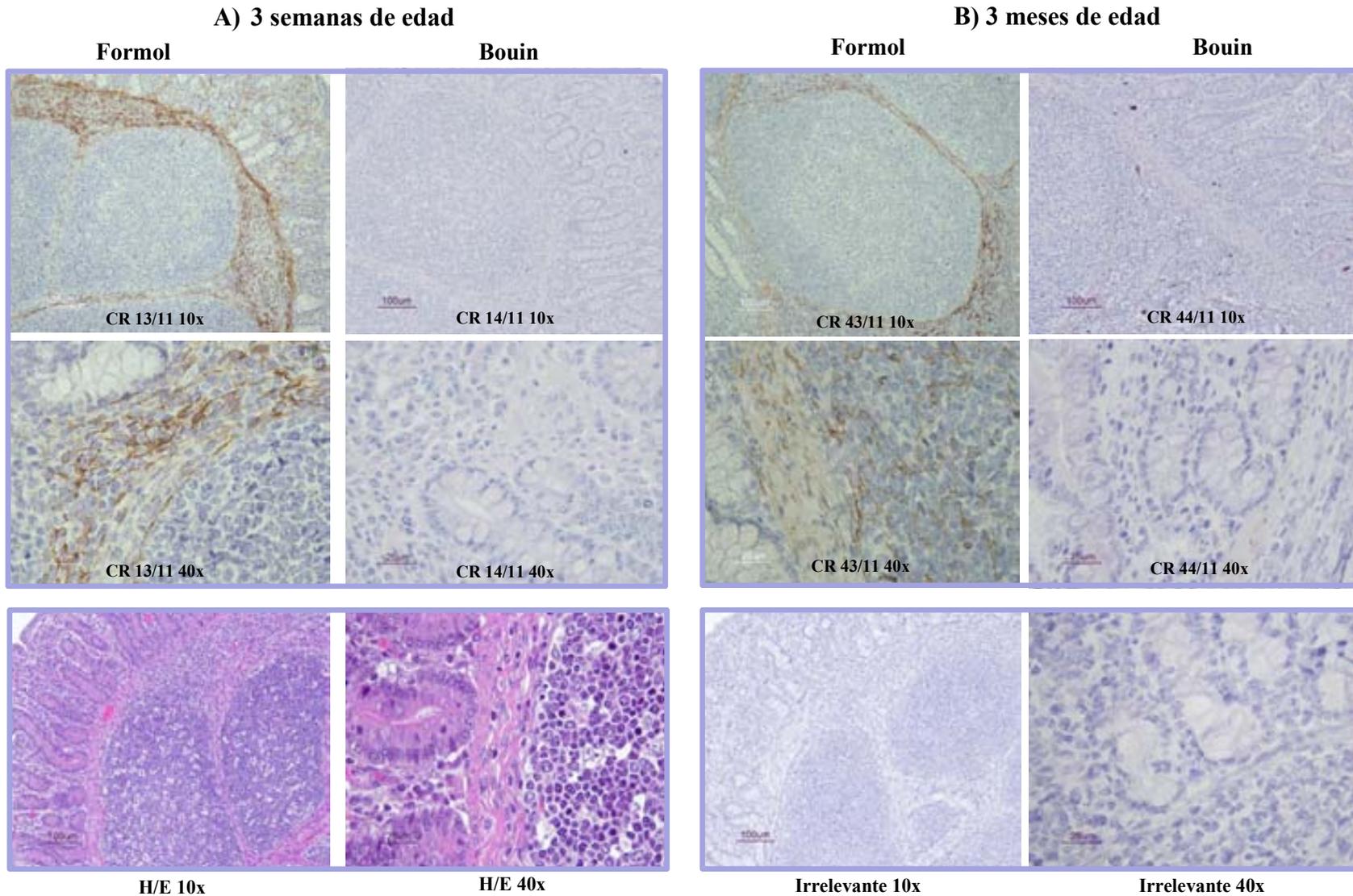


Figura 13f. Marcaje para TLR9 en cortes de ileon (placas de Peyer). La primera y la segunda fila muestran el resultado a 10x y 40x respectivamente; la tercera fila es una imagen 10x ó 40x de un corte de tejido teñido con hematoxilina/eosina o con un anticuerpo irrelevante que se muestran con fines de comparación. A) Muestras de animales de 3 semanas de edad; B) Muestras de animales de 3 meses de edad. En ambos casos se muestran los resultados obtenidos al utilizar tejidos fijados con formol o fijador de Bouin.

4.2. Especificidad de los anticuerpos utilizados frente a los TLRs porcinos

4.2.1. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en PAMs

El uso de los anticuerpos anti-TLRs porcinos mediante IFI reveló un marcaje intracelular específico y localizado por todo el citoplasma celular. En concreto, el marcaje de TLR3 y TLR9 se presentaba como un punteado intenso en distintas zonas del citoplasma mientras que para TLR7 el marcaje se distribuía de forma difusa en el citoplasma (Figura 14).

Es interesante destacar que la expresión basal de TLR3 y de TLR9 en los PAMs sin estimular fue muy alta. Esta expresión basal se observa desde tiempo 0 horas hasta las 12 horas de cultivo de los PAMs, observándose una disminución de esta expresión basal a partir de las 24 horas de incubación. Para descartar que esta expresión basal de TLR3 y TLR9 fuera un marcaje inespecífico, se utilizaron una serie de controles negativos con los anticuerpos irrelevantes correspondientes, que definitivamente no mostraron marcaje de fondo (Figura 14). Los resultados preliminares obtenidos con esta prueba fueron corroborados posteriormente con otras técnicas. Así, para determinar la especificidad de la reactividad de los anticuerpos anti-TLRs humanos comercializados (TLR3 y TLR7) con indicación de reactividad anti-TLR porcino, se procedió a la realización de un Western Blot a partir de extractos purificados de proteínas procedentes de distintos cultivos de PAMs estimulados con los ligandos correspondientes y/o con distintas cepas de PRRSV a diferentes tiempos. Se seleccionaron las condiciones de incubación que producían con mayor estimulación en la producción del TLR estudiado (obtenidas de los resultados de las pruebas de IFI y de CMF). Además, como control interno de la prueba se utilizó la β -actina. Para TLR9 no se realizó dicha comprobación porque el anticuerpo comercial ya era específico de porcino. Los resultados de estas pruebas mostraron que el marcaje de TLR3 de los cultivos *in vitro* de los PAMs se correspondía a una proteína de 103 kDa lo que corresponde con el peso molecular esperado para TLR3 (Figura 15). En cuanto a la detección de TLR7, no se pudo demostrar su especificidad mediante esta prueba debido a una falta de anticuerpos comerciales adecuados para esta técnica. Se probaron dos clones diferentes de anticuerpos, el previamente usado para IFI y CMF, y otro comercializado para WB, específico para porcino (TLR7 policlonal de conejo, Abnova, Taiwán) sin obtener un resultado favorable.

Resultados

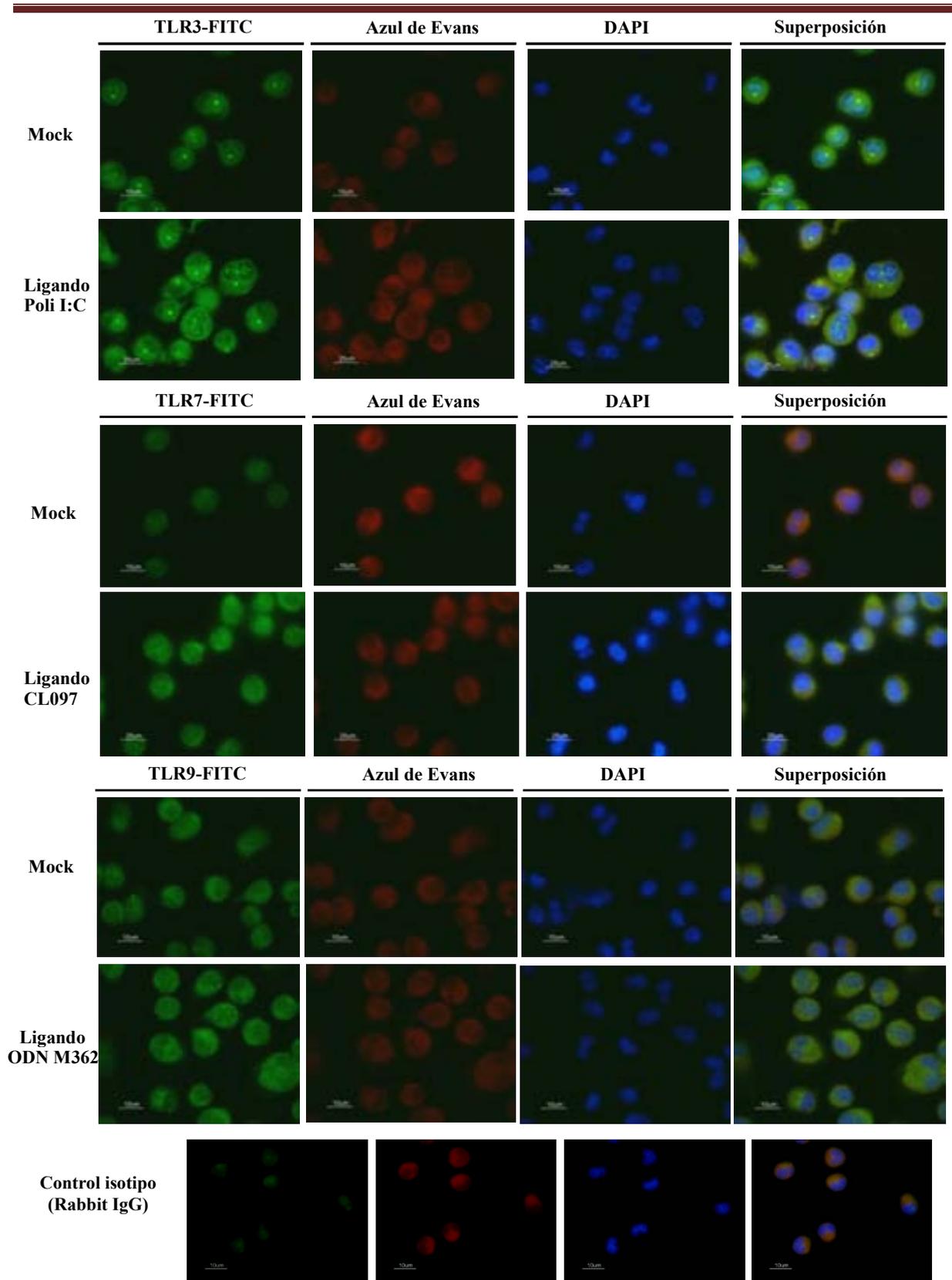


Figura 14. Marcaje (12 horas de cultivo) de los distintos TLR en PAMs estimulados con los ligandos específicos para cada uno de los TLRs o sin estimular (mock). En la última fila se muestran imágenes representativas de los controles de isotipo (anticuerpo irrelevante). Anticuerpos utilizados: a) TLR3 y TLR7: Ig de conejo anti-TL3 o anti-TLR7 humano; b) TLR9: IgG de conejo anti TLR9 porcino. En la segunda columna, marcaje con azul de Evans para delimitar el citoplasma y en la tercera, marcaje con *DAPI* (4',6'-diamino-2-phenylindole) para la localización del núcleo. La última columna muestra la superposición informática de los anteriores marcajes para una mejor visualización de los resultados.

Resultados

4.2.2. Técnica de Western Blot (WB) en PAMs

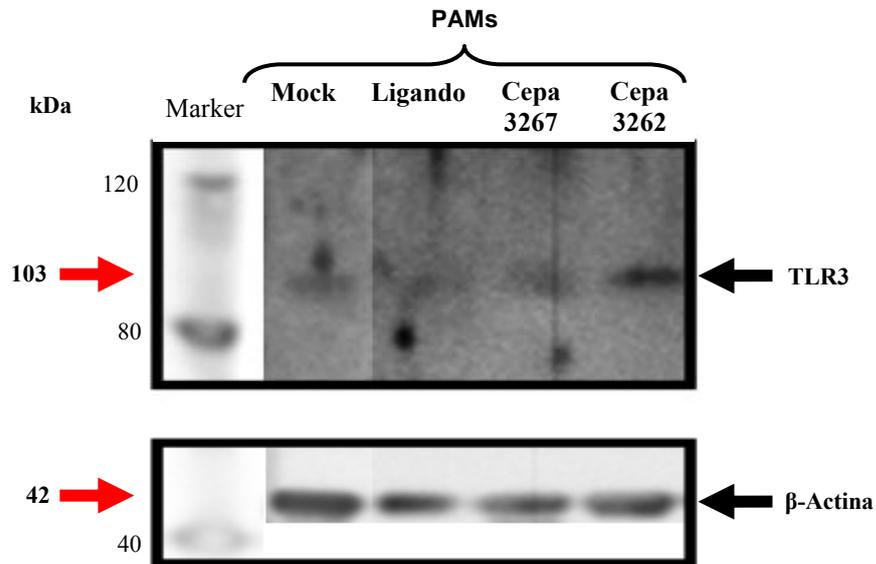


Figura 15. Western Blot para la detección de TLR3 de un lisado de PAMs cultivados con los distintos estímulos y condiciones de incubación favorables para su expresión. La presencia de TLR3 se detecta en PAMs en reposo, se intuye en los cultivos con ligando poli I:C y se observa claramente a las 48 horas post infección con la cepa de PRRSV 3262. El control de β -actina aparece con expresión constante en cada una de las condiciones presentadas.

4.2.3. Citometría de Flujo (CMF) para los distintos TLR aplicada a PAMs

La expresión basal de los TLRs y su cinética de expresión se analizó mediante CMF en los PAMs cultivados en medio de cultivo sin ningún estímulo adicional. La expresión basal (tiempo 0 horas de incubación) para TLR3 y TLR9 fue notoria; en cambio, para TLR7 no se detectaba expresión en los PAMs en reposo a tiempo 0h de incubación (Figura 16).

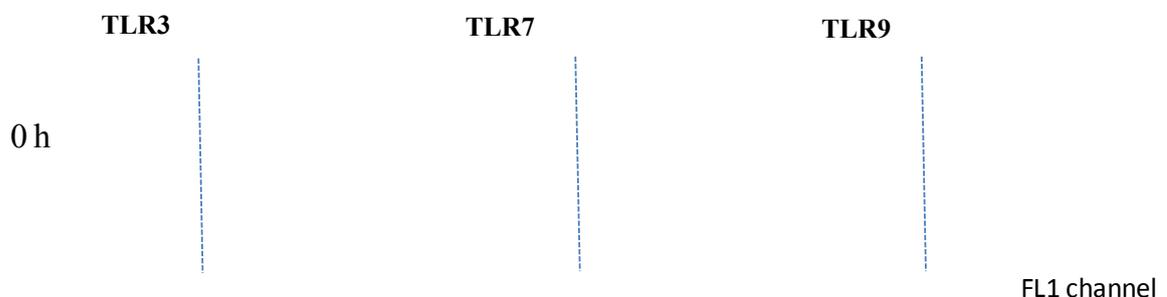


Figura 16. Citometría de flujo de PAMs mantenidos en medio de cultivo para los diferentes TLRs a tiempo 0 horas de incubación. Los histogramas de fondo blanco muestran las células teñidas con un isotipo irrelevante y un secundario conjugado con fluoresceína. Los histogramas de fondo rojo indican las células no infectadas a tiempo 0 horas marcadas con el anticuerpo primario del TLR pertinente seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína.

Resultados

Para confirmar esta observación se descongelaron hasta tres lotes distintos de macrófagos y las pruebas de citometría de flujo se realizaron por triplicado. Los resultados de todas estas pruebas fueron similares aunque la intensidad de la expresión basal de los TLRs podía variar ligeramente en función del lote.

Durante el estudio de cinética de los PAMs en medio de cultivo sin virus, es interesante observar que a las 12 horas de cultivo, es cuando existe la mayor proporción de PAMs expresando los TLRs estudiados (Figura 17). Este incremento va precedido de una progresiva reducción de la población positiva a los TLR3 y TLR7. Es decir, parece ser que los PAMs ante la falta de estimulación antigénica o de un ambiente de citoquinas adecuado van perdiendo esta expresión inicial de los TLR3 y TLR7, y que es muy evidente ya a partir de las 36-48 horas de incubación. Esta pérdida de marcaje, también podría deberse a un incremento de la mortalidad de estas células. En cambio esta reducción no es tan evidente con el TLR9 (cuya expresión tiene una parte constitutiva), y lo que se observa es más bien una expresión basal más o menos constante en todos los puntos, excepto a partir de las 48 horas que es menor seguramente por un tema de viabilidad celular (Figura 17).

A partir de estos resultados, se planteó la posibilidad de dejar los macrófagos en reposo hasta pasadas 48 horas post infección (48 horas PI) para que se produjera esta disminución del marcaje basal. Pero si recordamos, estos PAMs eran previamente descongelados y mantenidos en cultivo para su adaptación unas 18-20 horas antes de ser incubados y analizados con los distintos estímulos o virus. Esto significaría que deberíamos de usar PAMs muy envejecidos, un hecho que podría influir en los resultados de los experimentos de infección *in vitro*. Para no arriesgarnos a perder a la viabilidad de los macrófagos y al no pretender cuantificar, sino tener una visión cualitativa del grado de regulación que se producirá con la infección *in vitro*, se decidió trabajar con el cultivo a 18 horas y asumir esta expresión basal como punto de partida.

Resultados

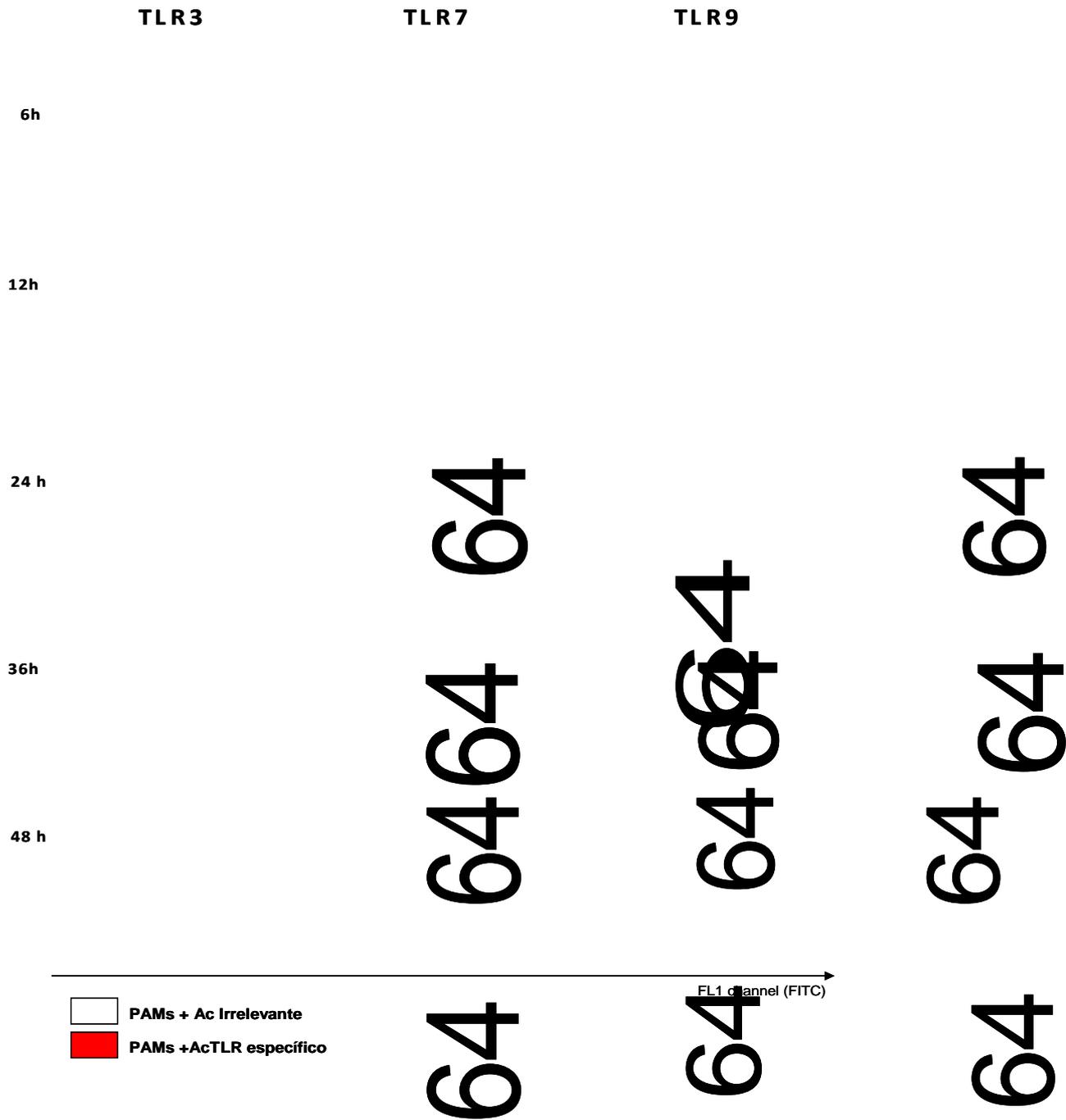


Figura 17. Histogramas de la cinética de expresión intracelular de los TLRs mediante citometría de flujo. Los histogramas de fondo blanco muestran las células teñidas con un isotipo irrelevante y un secundario conjugado con FITC. Los histogramas de fondo rojo indican las células no infectadas y cultivadas en medio de cultivo a diferentes tiempos, marcadas con el anticuerpo primario del TLR pertinente seguido de un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína

Resultados

4.3. Pruebas de infección *in vitro* de los PAMs.

4.3.1. Capacidad replicativa de las cepas de PRRSV del ensayo.

La verificación del título y la capacidad de replicación de cada una de las cepas de PRRSV usadas en los experimentos se realizó mediante diferentes métodos: TCID₅₀ (cultivo en PAMs y revelado por inmunofluorescencia) y determinación del número de copias genómicas (RT-PCR a tiempo real). El título de partida de las cepas fue 10^{6,0} partículas víricas/mL para la cepa 3262 (TNFα⁺/IL10⁺), 10^{6,1} partículas víricas/mL para la cepa 3267 (TNFα⁻/IL10⁻) y 10^{5,5} partículas víricas/mL cepa vacunal atenuada. De acuerdo a la RT-PCR en tiempo real, el n° de copias genómicas era de 10^{6,1} para la cepa 3262 y 10^{6,28} para la 3267 (Tabla 11). Estos resultados nos permitieron confirmar que estábamos trabajando con una dosis infectiva vírica muy similar entre ambas cepas.

4.3.1.1. Cinética de replicación viral mediante TCID₅₀ por IFI

El revelado de la IFI de los diferentes cultivos permitió observar diferente comportamiento de replicación y la viabilidad celular entre las dos cepas de virus usadas (Figura 18). Por otro lado, los resultados de la IFI nos permitieron calcular la TCID₅₀ en los sobrenadantes de los cultivos de PAMs a diferentes tiempos de infección (Tabla 11).

Los resultados de esta cinética de replicación vírica nos indican que dos determinadas cepas de PRRSV ajustadas a la misma m.o.i de infección inicial, tienen una cinética de replicación diferente en los cultivos de PAMs (Figura 18). Como se observa en la figura 18, a las 12 horas post infección vemos que la cepa 3267 presenta un número más elevado de células positivas (15-20%) respecto a la 3262 (5-10%).

Resultados

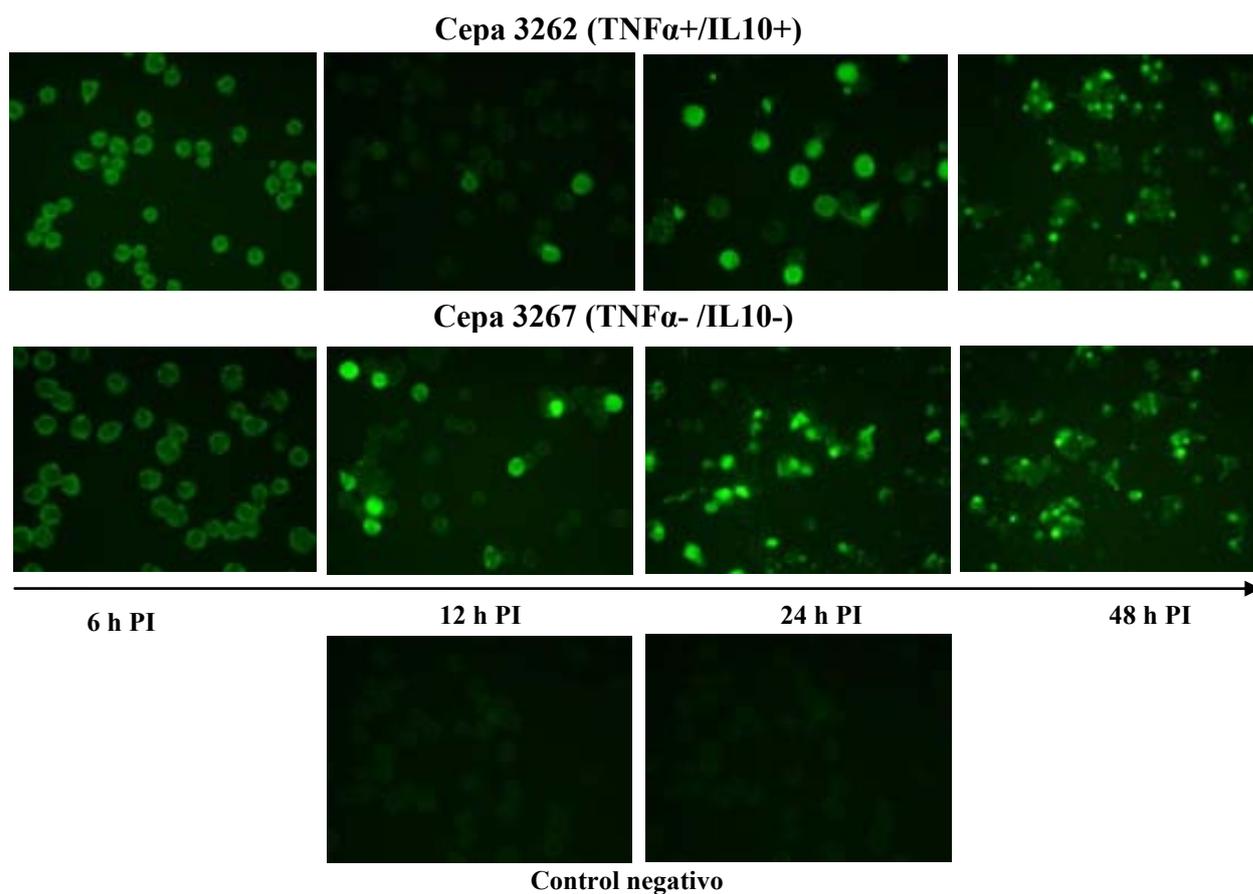


Figura 18. Immunofluorescencia de los PAM infectados con distintas cepas de PRRSV a los diferentes tiempos. Los PAM permeabilizados con metanol a -20°C fueron marcados con el anticuerpo primario ORF7-PRRSV Mouse IgG Anti-Pig (1CH5) y el secundario Anti-Mouse IgG2a -FITC. Control negativo – macrófagos no infectados y marcados con los mismos anticuerpos. Aumento 40x.

A partir de las 24 horas PI se empiezan a observar diferencias en la capacidad citopática entre las cepas víricas utilizadas (Figura 18). De este modo, la cepa 3267 parece inducir un efecto citopático en los macrófagos más rápido y evidente que la cepa 3262. Finalmente, a las 48 horas PI este efecto citopático es evidente en ambas cepas víricas (Figura 18).

Resultados

4.3.1.2. Cuantificación título viral mediante RT-PCR a tiempo real (RT-PCR rt)

- **La elaboración de la recta de calibrado:**

Antes de empezar el experimento se ha construido la recta de control que refleja la relación entre el logaritmo de la cantidad de virus (eje de las ordenadas) y los ciclos (CT) de la RT-PCR rt (eje de las abscisas). Se utilizó una batería de diluciones del cDNA de la cepa 3262 con la concentración inicial de 98 µg/µl. La primera muestra tenía $1,3 \times 10^{10}$ números de copias víricas. En la Figura 19 puede verse la recta de regresión ($r^2 = 0,99$) resultante de la comparación de los valores de CT y el número de copias de la ORF7 incluidas en la serie de calibración, con unos valores de desviación estándar muy pequeños ($p < 0,05$). La sensibilidad de la prueba estaba entre 1 y 10 copias víricas considerándose negativas las muestras con $CT > 35$.

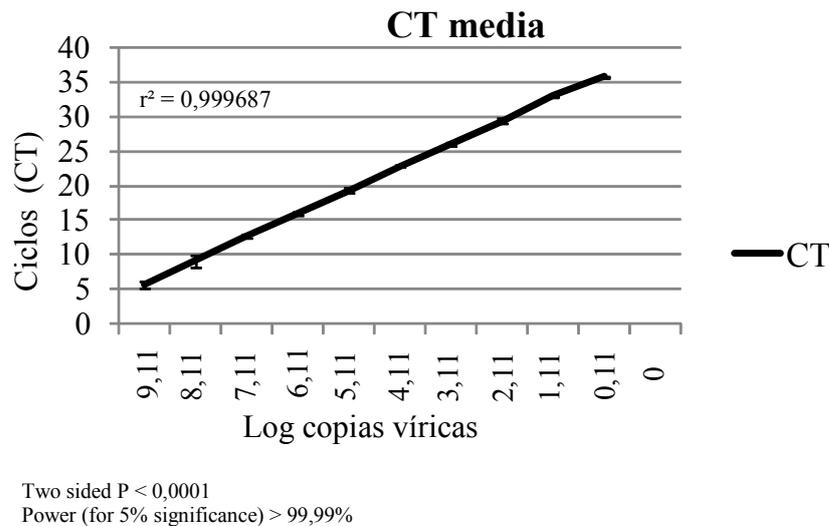


Figura 19. Representación de la recta de calibración de la RT-PCR rt. En el eje de las abscisas se muestra el número de copias de cDNA vírico de la cepa 3262; en el eje de las ordenadas se detallan los ciclos de la RT-PCR rt (CTs).

Resultados

- **Cinética de infección mediante copias genómicas víricas:**

La cuantificación del número de copias genómicas del PRRSV se realizó sobre el pellet de células de los cultivos *in vitro*. Así se calculó la cantidad de virus asociado a células (VAC).

La cinética de infección de los PAMs nos revela que efectivamente, como ya se observaba en la IFI, la cepa 3267 tiene una mayor capacidad de replicación a partir de las 12h PI en comparación con la 3262 (Figura 20). La cepa 3262 parece replicarse peor en los PAMs tal como muestran los resultados de la RT-PCR rt donde tenemos unos valores de CT más altos, indicando una menor cantidad de virus asociado a células entre las 24 y 36 horas. En cambio con la cepa 3267, se observa un aumento progresivo de la concentración de copias víricas hasta las 48 horas, observándose una estabilización de los valores de CT entre las 24 y 36 horas [16 y 15 CT respectivamente, equivalente a unas $10^{6,1}$ copias víricas/mL, (Figura 19)].

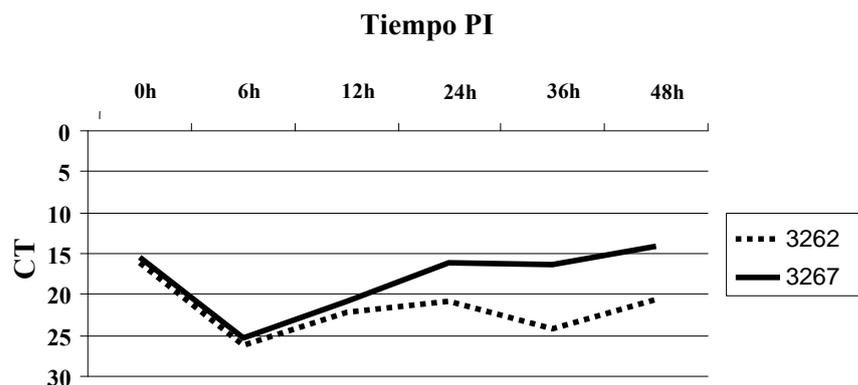


Figura 20. Gráfico del número de CT de la RT-PCR a tiempo real de la cantidad de virus asociado dentro de los PAMs infectados con las distintas cepas de PRRSV.

La disminución de la cantidad de copias víricas que se observa entre las 0 y 6 horas PI puede deberse al tipo de muestra analizada. El tiempo 0 corresponde realmente al título del inóculo viral del stock original que se utiliza para infectar los cultivos de PAMs, sin tenerse en cuenta que no representa únicamente a la cantidad de VAC. En cambio el resto de tiempos (de 6 - 48 horas) corresponden al número de copias genómicas que se encontraban en el interior de las células (VAC).

Resultados

Todos estos resultados de cinética viral mediante RT-PCR rt en cultivos de PAMs y mediante TCID₅₀ en sus sobrenadantes, se resumen en la Figura 21.

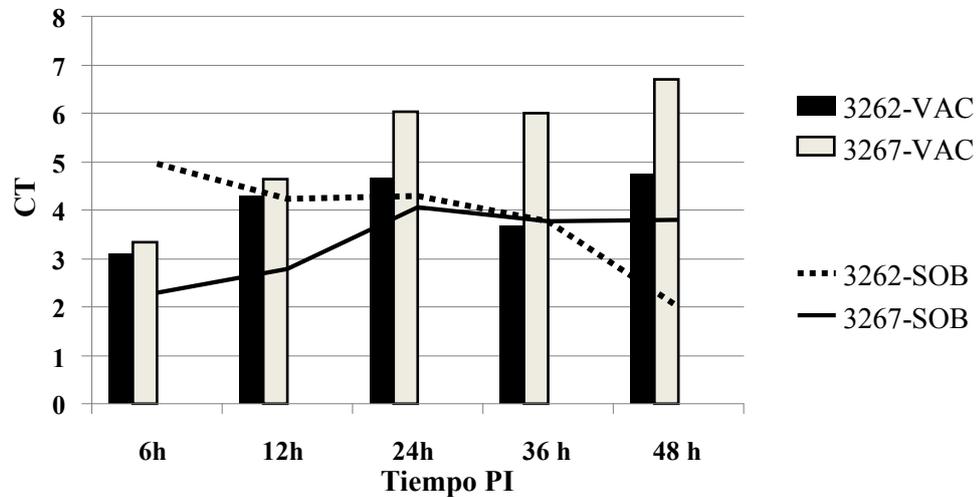


Figura 21. Relación de la replicación vírica de la cepa 3262 y 3267 del PRRS en los cultivos de macrófagos medido por CT de la RT-PCR rt. El gráfico lineal representa la cantidad de virus asociados a células (VAC). El gráfico de columnas representa la cantidad de virus libre obtenido del sobrenadante de estos cultivos (SOB).

En la Tabla 11 se representa la cantidad de virus obtenido en el sobrenadante (medido por TCID₅₀, partículas víricas/mL) y asociado a células (medido por RT-PCR rt, copias víricas/5μL) en función del tiempo de infección con las distintas cepas virales. En la tabla se muestra como a las 6 horas de infección el sobrenadante de los macrófagos infectados con la cepa 3262 tiene un título vírico mayor en comparación con el sobrenadante de los macrófagos infectados con la cepa 3267 ($10^{4,96}$ y $10^{2,3}$ respectivamente). Teniendo en cuenta las imágenes de la IFI previas, esto nos vendría a indicar que efectivamente la cepa 3267 tiene una mayor capacidad de penetrar e infectar al PAM que la cepa 3262. De hecho, la cepa 3262 tiene un título de $10^{2,0}$ a las 48 horas post infección que es un título parecido al título que tenía la cepa 3267 a 6 horas PI ($10^{2,3}$). Estos resultados nos están indicando que la cepa 3262 se está replicando a niveles muy bajos dentro de los PAMs (el título de VAC de esta cepa está alrededor de $10^{4,0}$ copias víricas/5μL durante 12-36 horas y a las 48 horas PI aumenta el título hasta $10^{4,76}$).

Resultados

Tabla 11. Cinética de la replicación vírica en los cultivos de PAMs y en sus sobrenadantes.

Horas	Cepa 3262		Cepa 3267	
	SOB-PAMs* (partículas víricas/mL)	VAC-PAMs** (copias víricas/5µL)	SOB-PAMs* (partículas víricas/mL)	VAC-PAMs** (copias víricas/5µL)
0***	$10^{5,98}$	$10^{6,1}$	$10^{6,14}$	$10^{6,28}$
6	$10^{4,96}$	$10^{3,11}$	$10^{2,3}$	$10^{3,32}$
12	$10^{4,24}$	$10^{4,29}$	$10^{2,79}$	$10^{4,65}$
24	$10^{4,3}$	$10^{4,67}$	$10^{4,05}$	$10^{6,04}$
36	$10^{3,78}$	$10^{3,69}$	$10^{3,77}$	$10^{6,0}$
48	$10^{2,0}$	$10^{4,76}$	$10^{3,79}$	$10^{6,7}$

* Titulación vírica medida por el método TCID₅₀ del virus libre en el sobrenadante de los cultivos (SOB). ** Titulación vírica medida por RT-PCR rt del virus asociado a PAMs. Los cultivos de PAMs fueron infectados con inóculos virales a m.o.i. = 1. *** Título del inóculo inicial (stock viral) antes de infectar a las células.

4.3.1.3. Determinación de citoquinas en sobrenadantes de PAMs infectados

Los resultados de la replicación vírica se contrastaron con los resultados de inducción de citoquinas que poseían las distintas cepas en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos. Si recordamos el perfil de citoquinas de estas cepas en cultivos de células dendríticas tenemos que la 3262 era doble positiva a TNF- α /IL-10+ y la cepa 3267 era negativa para ambas citoquinas (Gimeno *et al.*, 2011).

En la figura 22 podemos ver los gráficos de la concentración de TNF- α de ambas cepas virales.

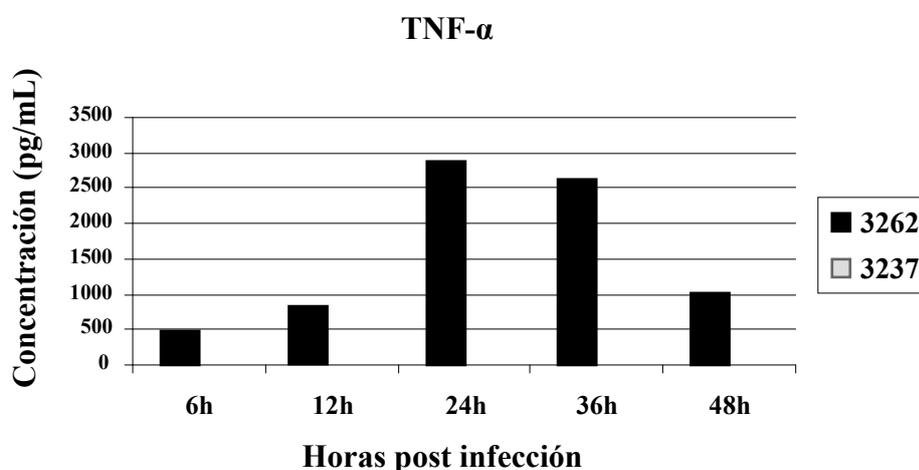


Figura 22. Cinética de la producción de TNF- α en sobrenadantes de PAMs infectados con las distintas cepas de PRRSV.

Resultados

Los resultados de la producción de TNF- α nos indican que la cepa 3262 era capaz de inducir esta citoquina en los cultivos de PAMS y además con un pico de producción notable a las 24 horas PI (2889 pg/mL). Esta producción se mantiene hasta las 36 horas (2631 pg/mL) y seguidamente empieza a disminuir a las 48 horas (1003 pg/mL), coincidiendo con la presencia del efecto citopático en las células. Por el contrario, la cepa 3267 no fue capaz de inducir la producción de esta citoquina en los PAMs.

No se pudo detectar la presencia de IL-10 en los sobrenadantes de los PAMs infectados en ninguna de las cepas examinadas, aunque la 3262 es capaz de inducir IL-10 en cultivos de células dendríticas (Gimeno *et al.*, 2011).

4.4. Regulación de los TLRs en PAMs infectados con distintas cepas de PRRSV

4.4.1. Regulación de los TLRs examinada mediante CMF

La infección de los cultivos de PAMs fue realizada a dos dosis infectivas distintas (m.o.i.=0,1 y 1). La m.o.i. de 0.1 simularía una infección más parecida a lo que ocurriría en una infección natural pero con el inconveniente que la regulación de los TLRs puede ser fruto de un efecto paracrino y no de la interacción directa con el virus. Por el contrario, la m.o.i. de 1 nos reduciría este efecto paracrino forzando la infección de cada una de las células del cultivo por una partícula vírica.

Dada la concentración de virus en los inóculos disponibles, la dosis infectiva más baja nos permitió realizar los experimentos de infección con las tres cepas de PRRSV en tanto que para la dosis infectiva alta (m.o.i.=1) únicamente se pudieron probar las cepas 3262 y 3267.

a) Regulación del TLR3:

Los resultados de la cinética de expresión del TLR3 en los cultivos de PAMs con las distintas cepas víricas mediante citometría de flujo, nos mostró como a partir de las 24 horas PI, la expresión basal disminuía en los cultivos de PAMs no infectados o infectados con la cepa vacunal. En cambio, esta expresión se mantenía elevada (24-36 horas PI) en los PAMs estimulados con las cepas de campo (Figura 23).

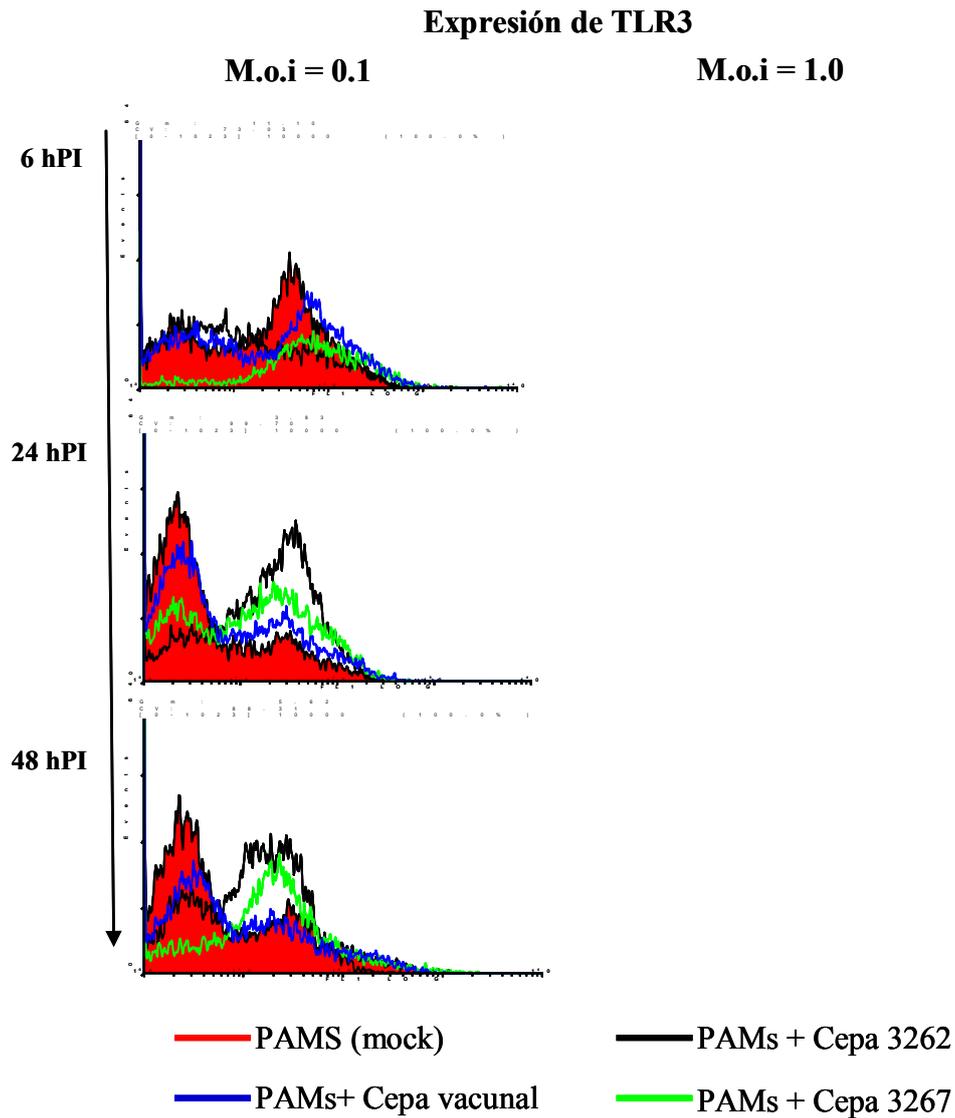


Figura 23. Histogramas de un experimento representativo de la cinética de expresión del TLR3 en cultivos de PAMs infectados con distintas dosis infectivas (columna de la izquierda a m.o.i.=0.1 y de la derecha a m.o.i=1) de las distintas cepas de PRRSV (3262, 3267 y cepa vacunal). El gráfico en rojo representa la expresión basal de TLR3 en macrófagos sin infectar; en negro se representa la expresión del TLR3 en macrófagos cultivados con la cepa 3262; en verde, la expresión del TLR3 en macrófagos cultivados con la cepa 3267; en azul, la expresión del TLR3 en macrófagos cultivados con la cepa vacunal de PRRSV.

Estas diferencias en la expresión del TLR3 eran mucho más evidentes cuando se utilizaba una carga infectiva mayor (m.o.i.=1) y sobre todo con la cepa 3262 (Figura 24).

Resultados

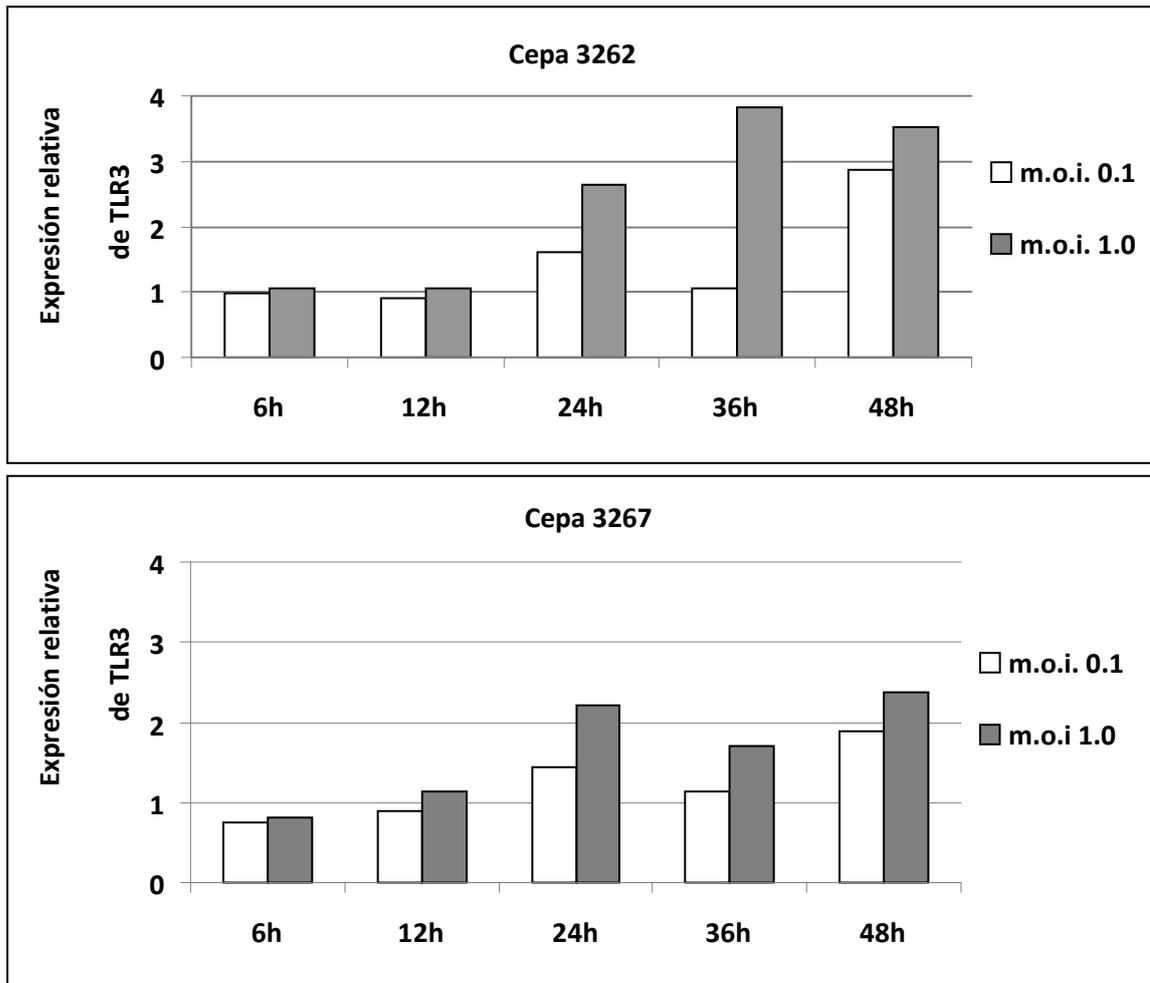


Figura 24. En el panel superior se muestra la expresión relativa del TLR3 en los PAMs infectados con la cepa 3262 y en el panel inferior con la cepa 3267. Esta expresión relativa está calculada respecto a los valores de expresión basal del TLR3 en las células no infectadas (media de expresión de TLR3 en las células infectadas dividido por la media de expresión basal de TLR3 en las células no infectadas). Las columnas de gráficos representan las diferente dosis utilizadas para la infección de los PAMs (columnas blancas: m.o.i.=0,1; columnas grises: m.o.i.=1).

Los resultados estadísticos determinaron que, efectivamente, la estimulación del TLR3 era mucho más evidente a partir de las 24 horas PI con las dos cepas de campo y sobre todo con la cepa 3262, en relación a la expresión con la cepa vacunal o el cultivo de PAMs sin infectar (Figura 25).

Por otra parte, vemos que la cinética de expresión del TLR3 en PAMs infectados con la cepa vacunal se comporta como el cultivo de macrófagos no infectados. En realidad, esta cepa vacunal de PRRSV, es una cepa que ha sido atenuada y adaptada en cultivos de líneas celulares de MARC-145, y que crece muy mal en cultivos de PAMs; es decir, esta cepa se replica a unos niveles muy bajos e incluso nulos en los macrófagos porcinos. Como

Resultados

consecuencia vemos que la estimulación que produce esta cepa atenuada en los PAMs es similar a la ausencia de virus, sugiriendo que es la replicación activa vírica la que tiene un efecto positivo en la expresión de TLR3 en los PAMs, y no tanto la presencia de componentes víricos en el cultivo.

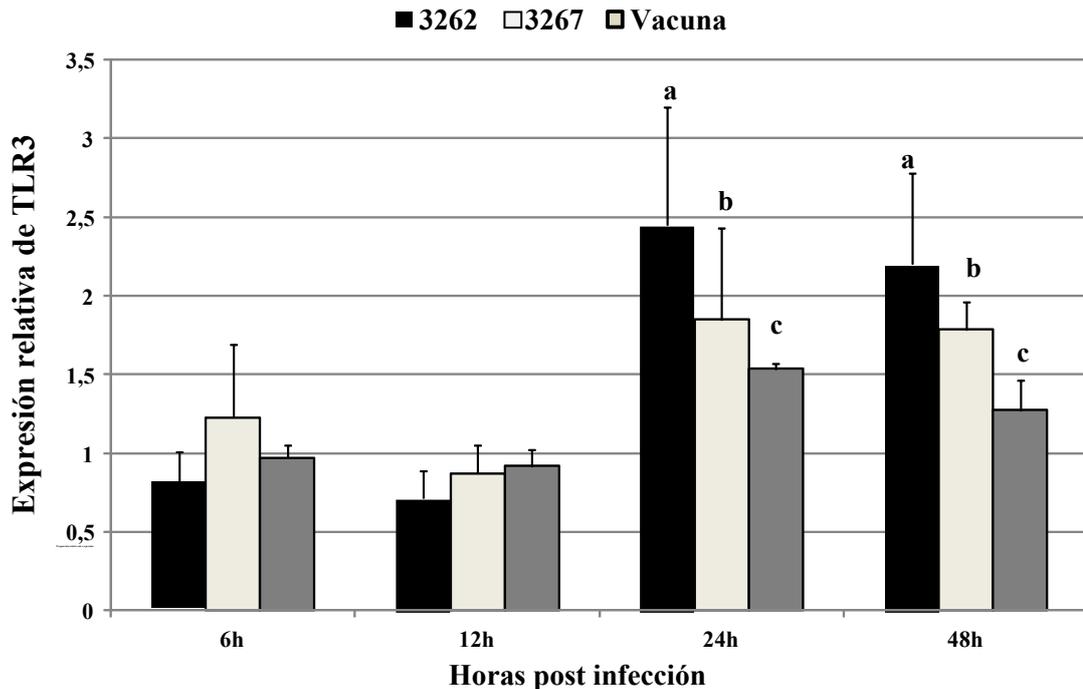


Figura 25. Proporción relativa de expresión de la TLR3 en los PAMs infectados con las cepas víricas a m.o.i. 0,1 (columna negra, cepa 3262; columna gris claro, 3267; columna gris fuerte, cepa vacunal), respecto al control de PAMs no infectados. La expresión relativa indica el valor surgido de la media de expresión de TLR3 en las células infectadas dividido por la media de expresión basal de TLR3 del control no infectado. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican con superíndices diferentes (a,b,c).

b) Regulación del TLR7:

Respecto a la regulación de TLR7 (Figura 26), a dosis de infección bajas (m.o.i.=0,1) no se vieron diferencias entre los cultivos infectados con las distintas cepas y el cultivo control no infectado, excepto a un posible incremento a las 48 horas PI con la cepa 3262.

Resultados

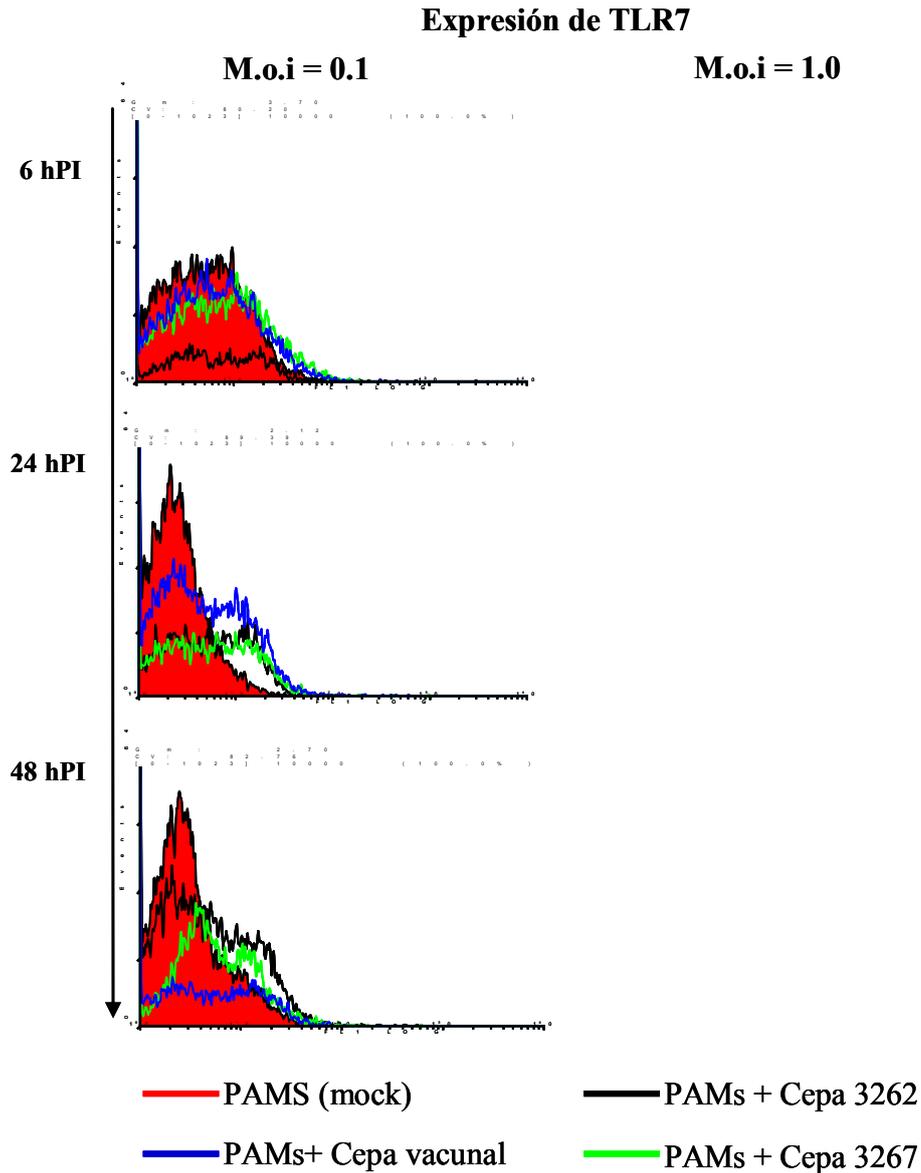


Figura 26. Histogramas de un experimento representativo de la cinética de expresión del TLR7 en cultivos de PAMs infectados con distintas dosis infectivas (columna de la izquierda a m.o.i.=0,1 y de la derecha a m.o.i.=1) de las distintas cepas de PRRSV (3262, 3267 y cepa vacunal). El gráfico en rojo representa la expresión basal de TLR7 en macrófagos sin infectar; en negro se representa la expresión del TLR7 en macrófagos cultivados con la cepa 3262; en verde, la expresión del TLR7 en macrófagos cultivados con la cepa 3267; en azul, la expresión del TLR7 en macrófagos cultivados con la cepa vacunal de PRRSV.

A dosis infectiva alta, parece que se produce una estimulación positiva de la expresión del TLR7 hacia las 48 horas PI en la cepa 3262, en comparación con la cepa 3267 (Figura 27).

Resultados

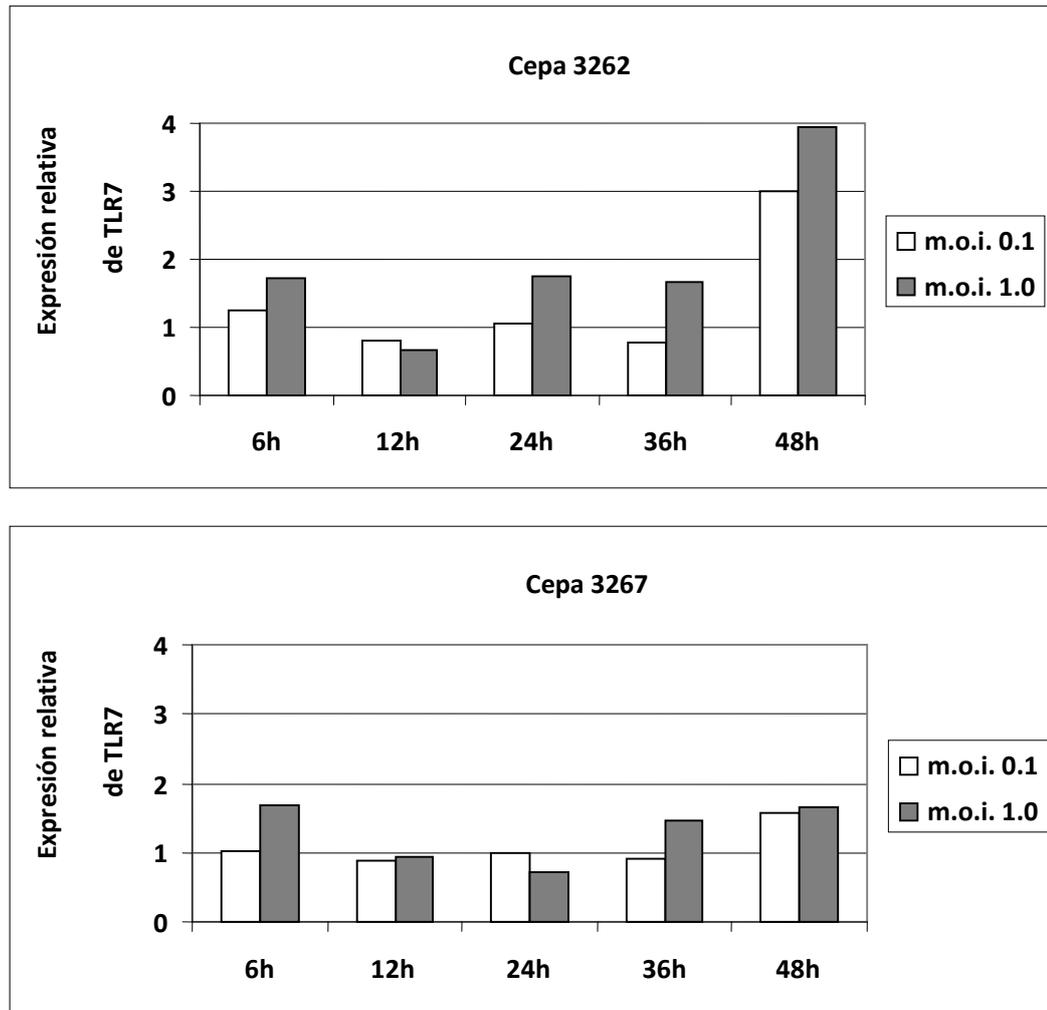


Figura 27. En el panel superior se muestra la expresión relativa del TLR7 en los PAMs infectados con la cepa 3262 y en el panel inferior con la cepa 3267. La expresión relativa está calculada respecto a la media de expresión de TLR7 en las células infectadas dividido por la media de expresión TLR3 en las células no infectadas (basal). Las columnas de gráficos representan las diferentes dosis utilizadas para la infección de los PAMs (columnas blancas: m.o.i.=0,1; columnas grises: m.o.i.=1).

Cuando los resultados se analizaron estadísticamente, no se observaron diferencias significativas entre los distintos cultivos infectados y controles, sugiriendo una misma cinética de regulación del TLR7 para las distintas cepas del PRRSV muy similar a la cinética de un cultivo sin estimular (Figura 28). Estos resultados sugieren que la regulación del TLR7 no parece estar afectado por el mecanismo de replicación de las distintas cepas del PRRSV.

Resultados

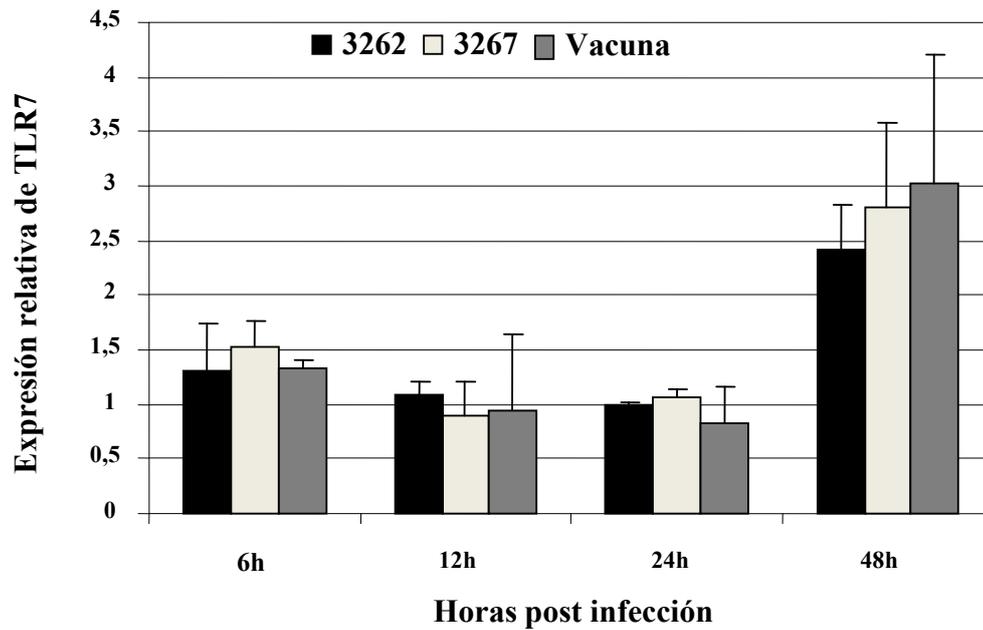


Figura 28. Proporción relativa de expresión de la TLR7 en los PAMs infectados con las cepas víricas a m.o.i. 0,1 (columna negra, cepa 3262; columna gris claro, 3267; columna gris fuerte, cepa vacunal), respecto al control de PAMs no infectados. La expresión relativa indica el valor surgido de la media de expresión de TLR7 en las células infectadas dividido por la media de expresión basal de TLR7 del control no infectado. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican con superíndices diferentes (a,b,c).

c) Regulación del TLR9:

La infección con las cepas 3262 y 3267 producía una ligera estimulación del TLR9 particularmente a partir de las 24 horas, independientemente de la dosis infectiva usada (Figuras 29 y 30), pero que no era estadísticamente significativo entre cepas (Figura 31).

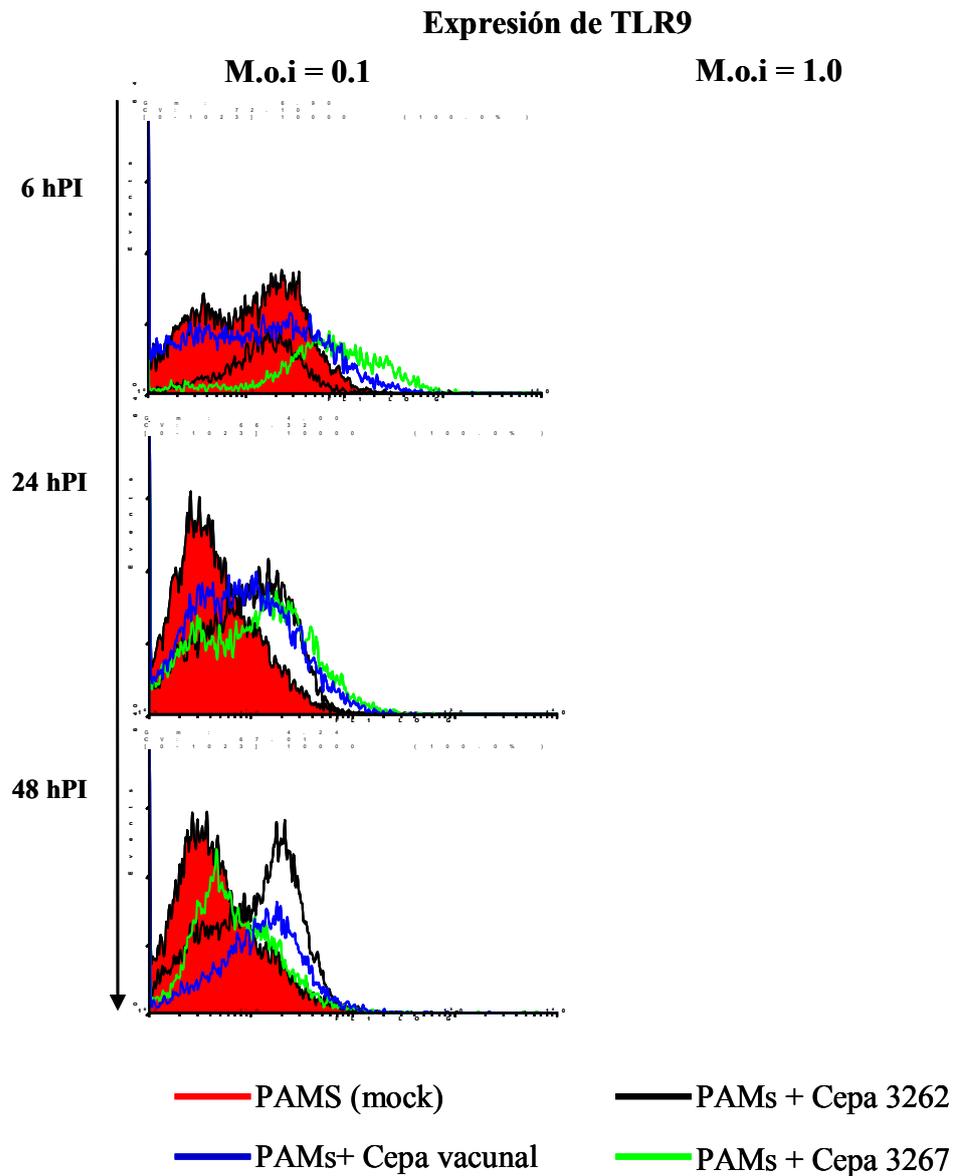


Figura 29. Histogramas de un experimento representativo de la cinética de expresión del TLR9 en cultivos de PAMs infectados con distintas dosis infectivas (columna de la izquierda a m.o.i.=0,1 y de la derecha a m.o.i.=1) de las distintas cepas de PRRSV (3262, 3267 y cepa vacunal). El gráfico en rojo representa la expresión basal de TLR9 en macrófagos sin infectar; en negro se representa la expresión del TLR9 en macrófagos cultivados con la cepa 3262; en verde, la expresión del TLR9 en macrófagos cultivados con la cepa 3267; en azul, la expresión del TLR9 en macrófagos cultivados con cepa vacunal de PRRSV.

64 64 64

Resultados

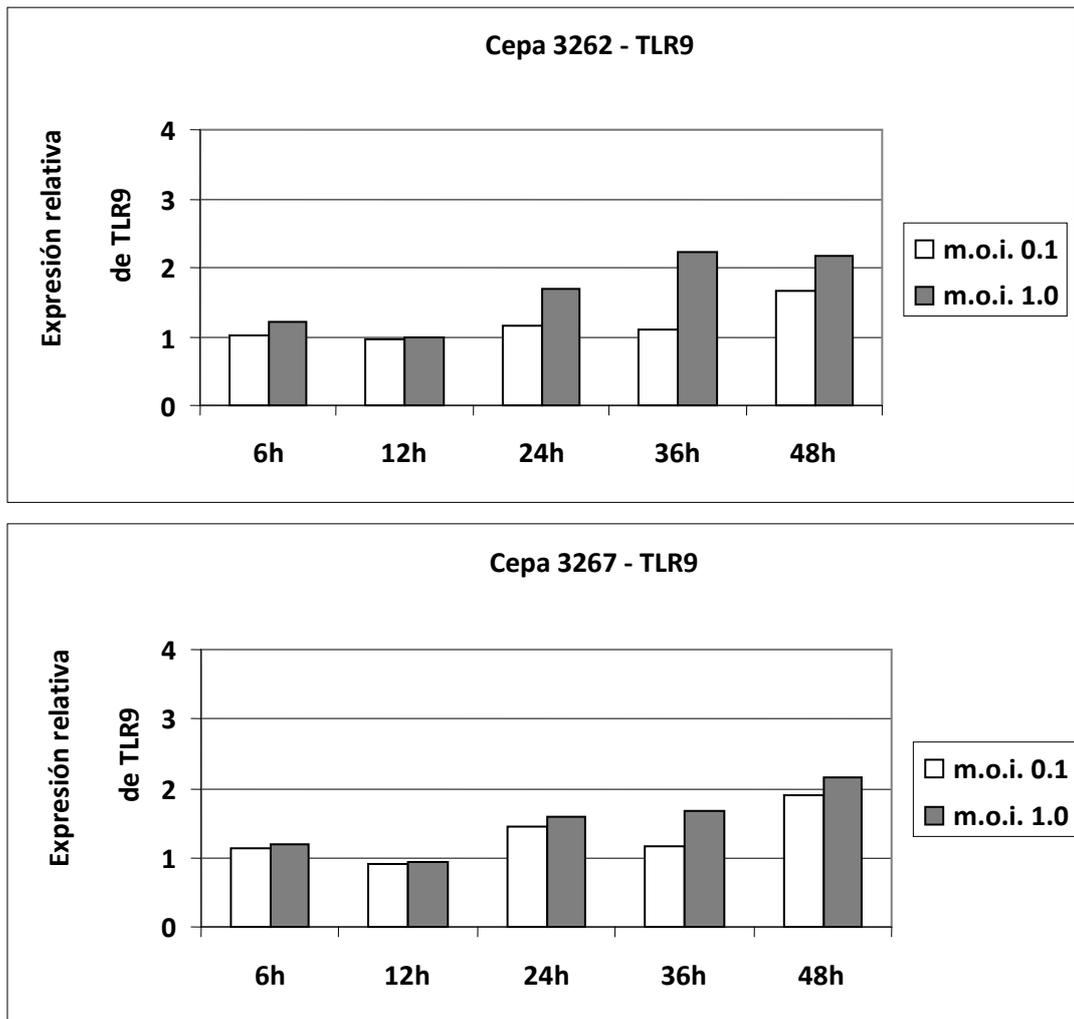


Figura 30. En el panel superior se muestra la expresión relativa del TLR9 en los PAMs infectados con la cepa 3262 y en el panel inferior con la cepa 3267. La expresión relativa está calculada respecto a la media de expresión de TLR9 en las células infectadas dividido por la media de expresión TLR9 en las células no infectadas (basal). Las columnas de gráficos representan las diferentes dosis utilizadas para la infección de los PAMs (columnas blancas: m.o.i.=0,1; columnas grises: m.o.i.=1).

Únicamente se observó una ligera disminución de la expresión del TLR9 con la cepa 3267 a las 12 horas PI ($61,73\% \pm 1,26\%$ células positivas, equivalente a un ratio de 0,9 en relación a la expresión basal del control no estimulado), en comparación con la cepa 3262 ($68,7\% \pm 2,16\%$, ratio de 1,09) y vacunal ($69,45\% \pm 1,35\%$, ratio de 1,1), $p < 0.03$ (Figura 31).

Resultados

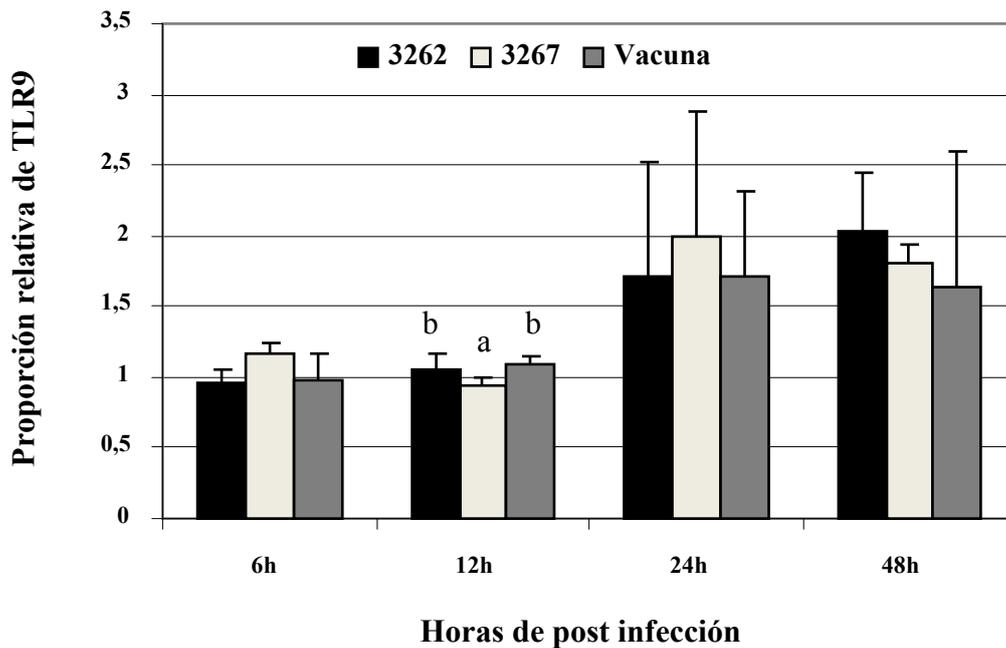


Figura 31. Proporción relativa de expresión de la TLR9 en los PAMs infectados con las cepas víricas a m.o.i. 0,1 (columna negra, cepa 3262; columna gris claro, 3267; columna gris fuerte, cepa vacunal), respecto al control de PAMs no infectados. La expresión relativa indica el valor resultante de la media de expresión de TLR9 en las células infectadas dividido por la media de expresión basal de TLR9 del control no infectado. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se indican con superíndices diferentes (a,b,c).

En resumen, los resultados de la citometría de flujo nos indican como las cepas de campo (3262, 3267) son capaces de inducir positivamente la expresión del TLR3 en los macrófagos alveolares, a partir de las 24 horas PI. Además esta inducción parece ser mucho más evidente con una de las cepas, la 3262 que es a su vez inductora de $\text{TNF-}\alpha$.

Por otra parte, vemos que los PAMs incubados con la cepa vacunal siguen manteniendo una cinética de expresión de los TLR3, TLR7 y TLR9 muy parecido a los cultivos no infectados.

Resultados

4.4.2. Regulación del mRNA de los TLRs mediante RT-PCRrt

Los resultados de la regulación del mRNA de los diferentes TLRs en PAMS infectados con las distintas cepas nos mostraron un mismo patrón de cinética.

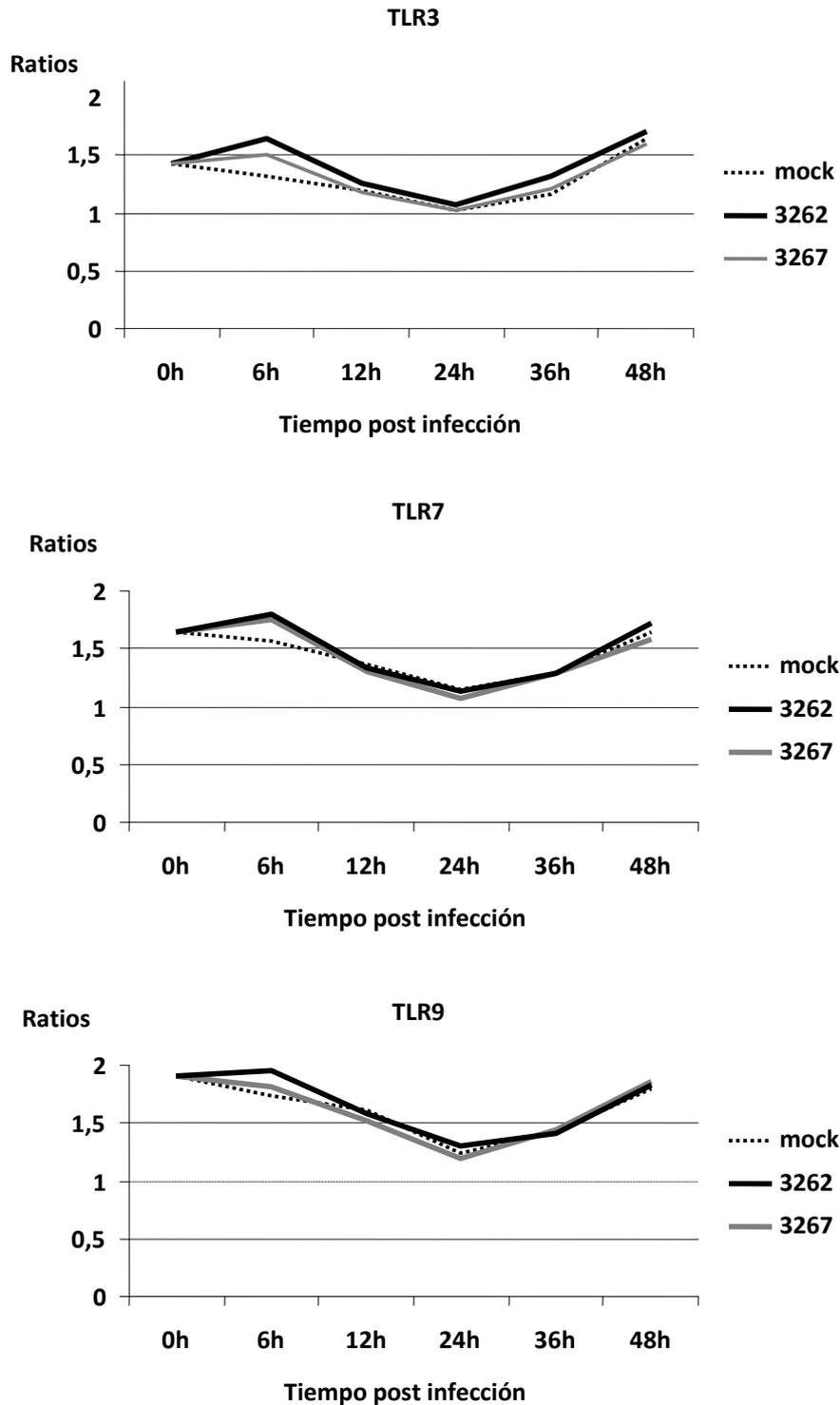


Figura 32. Cinética de expresión del mRNA de los distintos TLRs entre PAMS no infectados (mock) e infectados con las cepas 3262 y 3267 de PRRSV a m.o.i.=1. Ratio calculada respecto a la concentración de β -actina.

Resultados

En concreto, todos los TLRs examinados cuando se incubaban con las cepas 3262 y 3267 experimentaban un ligero incremento a las 6 horas PI respecto a los cultivos de PAMs sin infectar, aunque no era estadísticamente significativo. A continuación la transcripción del mRNA de los diferentes TLRs en PAMs infectados y no infectados (mock) sufrían un descenso hasta las 24 horas PI. A partir de ese tiempo, los niveles de mRNA volvían a incrementar de forma lineal hasta las 48 horas PI (Figura 32).

En definitiva, no se hallaron diferencias en la regulación de los transcritos de los TLRs a pesar de la infección con las distintas cepas. Esto sugiere que la regulación de los TLRs que observamos a nivel de proteína con el TLR3 básicamente, se debe producir a nivel post transcripcional.

5. DISCUSIÓN

Los TLRs son moléculas muy conservadas evolutivamente cuya función es el reconocimiento de patógenos y la activación de cascadas de producción de citoquinas necesarias para la supresión de estos patógenos (Medzhitov *et al.*, 2000). La mayoría de trabajos publicados sobre la expresión de los TLRs se centran en el ratón y el hombre mientras que otras especies como el cerdo han sido menos estudiadas. Inicialmente estos receptores se describieron en células del sistema inmune (Medzhitov, 2001; Takeda *et al.*, 2003; Alexopoulou *et al.*, 2001). Actualmente se sabe que los TLRs se expresan en casi todos los tejidos del organismo, pero su expresión y distribución depende de la especie y del tipo celular que se estudie.

En el caso concreto del cerdo existe muy poca información sobre la distribución tisular y celular de estos receptores. Esta falta de información es debida en parte a la escasa disponibilidad de anticuerpos comerciales específicos frente a TLR porcinos. A la hora de investigar la distribución de estos receptores, los tejidos linfoides constituyen una de las dianas de mayor interés debido a su función inmunológica. Para nuestro trabajo hemos elegido un órgano linfoide primario, el timo, y secundarios como el bazo, la tonsila, las placas de Peyer y distintos linfonodos. Asimismo, se han incluido los pulmones debido a su importante papel en la patogenia del PRRSV, cuyas dianas de replicación se cree que son los macrófagos y las células dendríticas (Darwich *et al.*, 2010).

Para realizar este primer estudio, se valoraron anticuerpos comerciales que podían tener una reactividad con TLRs 3, 7 y 9 porcinos y que podrían ser utilizados para el marcaje de tejidos fijados e incluidos en parafina. Además se examinaron tejidos de cerdos sanos de distintas edades (3 semanas y 3 meses de vida), para poder valorar posibles la posible influencia de la edad en la expresión de los mencionados TLRs en los tejidos. La elección de estas edades fue debida a resultados previamente publicados dónde mostraban que la expresión del TLR9 en los LN mesentéricos en cerdos adultos era más elevada que en los cerdos recién nacidos (Shimosato *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos nos han permitido valorar la distribución del TLR9 en los distintos tejidos examinados, pero no la de los TLR3 y TLR7. El marcaje del TLR9 se realizó con un anticuerpo comercial con reactividad específica para el porcino. En cambio, en el caso de

Discusión

TLR3 y TLR7 los anticuerpos se dirigían a las moléculas humanas pero, supuestamente, poseían reactividad cruzada con las moléculas de origen porcino. Así, por ejemplo, el marcaje obtenido con el anticuerpo anti-TLR3 fue muy variable en función del tejido utilizado, es decir, en algunos órganos como el pulmón, tonsila o linfonodos parecía ser específico, pero en otros órganos como en el hígado, producía un intenso color de fondo inespecífico. Debe reseñarse aquí, que el análisis en WB de este anticuerpo resultó específico para el TLR3 porcino, lo que nos hace sospechar que al tratarse de un anticuerpo policlonal, éste podría estar reaccionando de forma inespecífica con otras proteínas presentes en determinados órganos o tejidos. En las pruebas de estandarización se utilizaron distintos sistemas de permeabilización y exposición de los antígenos así como se bloqueó con suero irrelevante de conejo sin que ninguno de estos tratamientos solventara sustancialmente el problema. De hecho los hepatocitos (por su alta concentración de proteínas) o los eritrocitos son por norma general las células con más problemas de marcaje inespecífico.

Con relación al TLR7 no se consiguió ningún marcaje, pero tampoco se logró detectar una reactividad clara en WB por lo que cabría dudar de su especificidad para el porcino. Sin embargo, a tenor de las características del marcaje, sí se producía una reactividad aparentemente específica por IFI y CMF lo que induce a pensar que la falta de marcaje en las técnicas histológicas se debería al tipo de muestra y al que podría estar enmascarando epítomos esenciales para el reconocimiento por el anticuerpo específico.

La mayoría de los trabajos publicados hasta ahora en porcino se han centrado en valorar cambios en la expresión génica (mRNA) de los TLRs en los tejidos. Por ejemplo, se ha descrito la presencia de mRNA de TLR3 y TLR7 en distintos tejidos (Sang *et al.*, 2008b). Además, para el TLR3 se detecta mRNA en la placenta, páncreas, hígado, corazón, linfonodos, cerebro, intestino y glándula salivar (Rock *et al.*, 1998; Zarembler y Godowski, 2002; Bsibsi *et al.*, 2006). En esta tesis se ha valorado la expresión proteica de estos receptores pero no se ha determinado la expresión de su mRNA en los tejidos, por ello no podemos valorar si se producía o no un incremento de la transcripción de estos TLR3 y TLR7 en los distintos tejidos.

Una de las limitaciones de esta tesis ha sido la falta de controles positivos para el marcaje de TLR3 y TLR7. Cabe recordar aquí que los anticuerpos que se utilizaron se habían generado inicialmente con una reactividad frente a las moléculas humanas por lo que los controles

Discusión

adecuados hubieran sido tejidos tumorales de origen humano (que sobreexpresan estas moléculas). Un tejido de control humano adecuado para el TLR3 hubiera sido un corte de tumor gástrico (tal y como muestra la hoja técnica del anticuerpo) y para el TLR7, un hepatocarcinoma. Desafortunadamente, no se pudo disponer de estos controles porque se requería de un permiso por parte de las entidades legales (hospitales) que los suministraran incluyendo el consentimiento informado del paciente y la autorización del comité ético que no fue posible conseguir. En cambio, para el TLR9, anticuerpo específico para porcino, el tejido de control recomendado es una placa de Peyer, lo que se pudo conseguir sin problemas.

Con relación a la expresión del TLR9, la mayor parte de trabajos publicados se centran en tejidos humanos y murinos dónde se describe la expresión de mRNA en endotelios capilares y en células epiteliales. También se han detectado transcritos TLR9 en las células epiteliales del tracto respiratorio humano (Sha *et al.*, 2004). En el cerdo, se ha descrito la expresión de TLR9 en células del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal y en tejido adiposo (Burkey *et al.*, 2007; Tohno *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante inmunohistoquímica, se ha demostrado el marcaje de TLR9 en células del septo alveolar en pulmones sanos de cerdo (Schneberger *et al.*, 2011). Nuestros resultados confirman la expresión de TLR9 en los diferentes lóbulos pulmonares porcinos (apical, medio, accesorio y diafragmático) tanto en muestras de cerdos de tres semanas como en animales de tres meses de edad. El marcaje es claro en casi todas las células epiteliales de los septos alveolares que se corresponderían a células con apariencia de neumocitos lo que concordaría con el patrón de marcaje visto en humanos (Sha *et al.*, 2004) y en una descripción previa en porcino (Schneberger *et al.*, 2011).

Respecto al marcaje de TLR9 en los distintos linfonodos estudiados (submandibular, traqueobronquial, mesentérico e inguinal superficial) se constata un patrón de marcaje similar en todos ellos. Trabajos previos (Tohno *et al.*, 2006) indicaban que en el caso del porcino el marcaje de TLR9 podía variar en función de la edad del animal. Así, en cerdos recién nacidos (primer día de vida) se observaba marcaje tanto en células del interior como de la periferia del folículo linfoide mientras que en cerdos adultos, este marcaje se limitaba únicamente a la zona periférica de los folículos germinales. En nuestro caso se observó marcaje de TLR9 tan solo en la zona periférica de los folículos linfoides tanto en los cerdos de tres semanas de edad como los de tres meses. Esta diferencia podría señalar que la composición celular del folículo linfoide varía durante las tres primeras semanas de vida. La zona paracortical o córtex difuso profundo esta constituido por linfocitos T (Hochi *et al.*, 1986). También se ha descrito la

Discusión

presencia de grupos de células dendríticas cerca de la unión córtico-medular (Ramos, 1989) y la expresión de mRNA de TLR9 en células dendríticas y células B (Zarembek y Godowski, 2002; Hornung *et al.*, 2002; Rehli, 2002). Por lo tanto, es lógico pensar que el marcaje que apreciamos en los linfonodos corresponde a células dendríticas y a células epiteliales que pertenecen al epitelio asociado al folículo. El hecho de no observar marcaje de TLR9 dentro de los folículos linfoides, hace pensar que la expresión de este receptor en los linfocitos B sea una expresión inducida.

En relación al marcaje de TLR9 en las tonsilas, los resultados del presente estudio muestran una distribución peri-folicular de las células TLR9⁺ en animales de las dos edades estudiadas. Jonjic *et al.* (1987) examinaron la distribución de los linfocitos T en tonsila de los cerdos adultos, encontrando una gran similitud con los hallazgos descritos en linfonodos, aunque los folículos linfoides en tonsila son más pequeños y numerosos. Asimismo, otros autores demostraron en tejidos humanos la expresión de TLR9 en células T tonsilares, principalmente en células CD4⁺ (Mansson *et al.*, 2006). El marcaje obtenido en nuestro estudio histológico coincide con el marcaje descrito por estos autores, por lo que suponemos que en tonsilas sanas del cerdo, el TLR9 se expresa mayoritariamente en linfocitos de tipo T (por la localización del marcaje).

Respecto al timo, en nuestro caso el marcaje ha sido escaso y difuso dentro de la zona medular y no se ha producido en los corpúsculos de Hassall. La médula tímica consta de células epiteliales y de linfocitos T inmaduros o timocitos en forma más dispersa (Ramos, 1989); por el contrario, el córtex está formado por células tímicas nodriza que son células epiteliales que rodean a estos timocitos. A la luz de estos datos, aparentemente el TLR porcino solo se expresaría en las células epiteliales del timo. Desafortunadamente no podemos contrastar estos resultados con los de otros puesto que no existen trabajos previamente publicados al respecto.

Por lo que respecta al marcaje en el bazo, las células TLR9⁺ se observaron con distribución perivascular. Estas células tenían características mio-epiteliales. Dentro de las células marcadas hay unas células alargadas muy parecidas a fibroblastos o células reticulares. La mayor parte del marcaje se encuentra en la zona de la pulpa blanca. En el bazo ya se había descrito la expresión de mRNA del TLR9 pero no se había concretado la distribución de este marcaje (Chuang y Ulevitch, 2000).

Discusión

Finalmente en las placas de Peyer el marcaje de TLR9 se localiza alrededor de los folículos linfoides, coincidiendo con el marcaje del control positivo que muestra la ficha técnica del anticuerpo. En cambio, no existe marcaje alguno dentro de los folículos, compuestos básicamente de linfocitos B. Por lo tanto, el marcaje que observamos peri-folicularmente parecería corresponder a linfocitos T, macrófagos, CD para-foliculares y CD derivadas de monocitos, coincidiendo con lo previamente descrito en porcino (Macala *et al.*, 2000; Tohno *et al.*, 2006). El hecho de que, nuevamente, no se produjese marcaje en las áreas supuestamente ricas en células B - como ocurría en los linfonodos- y la constatación por otros autores (Tohno *et al.*, 2006) de que para inducir la expresión de TLR9 en estas áreas es precisa la estimulación con Poly (I:C) sintético y CpG-ODN sugiere que el TLR9 se expresa solo de forma inducible en los linfocitos B pero no es detectable en tejidos sanos sin estimular. De todas formas para poder corroborar el fenotipo exacto de estas células TLR9⁺ sería indispensable utilizar al mismo tiempo otros marcadores (anticuerpos frente CD3, CD4, CD8, CD21, Igs, MHC-II, SwC3, etc.) lo que resulta de una complejidad técnica importante cuando se utilizan tejidos fijados. Quizás la extracción desde los tejidos, el marcaje múltiple y su examen en citometría de flujo permitiera aclarar la expresión de este marcador en linfocitos B y T.

Otro resultado destacable, esta vez desde un punto de vista meramente técnico, es la diferencia que se observa en el marcaje en función del tipo de fijación usada para conservar los tejidos. Así, cuando se utilizó fijador de Bouin, era imposible marcar las muestras de pulmón, linfonodos y tonsilas de los lechones de tres semanas para TLR9. Esto no sucedía en los cortes de los animales de tres meses para los que el fijador utilizado parecía no tener influencia ninguna en la intensidad del marcaje. Se ha descrito previamente la existencia de diferencias en el marcaje inmunohistoquímico de inmunoglobulinas (Igs) en función del tipo de tratamiento y fijación; de este modo Ramos Vara (1989) no pudo detectar reactividad frente a diversas Igs en frotis de células linfoides fijados con Bouin; en cambio Reitamo y Reitamo (1978) detectaron con facilidad estas proteínas en cortes de tejidos incluidos en parafina y fijados en formol. En definitiva, probablemente el método de fijación de los tejidos y la edad de los animales puede influir en el éxito de la detección de ciertas proteínas, y en función de nuestros resultados la fijación con formol parece conservar mejor la expresión proteica del TLR9 independientemente de la edad del animal.

Discusión

En resumen, es la primera descripción que hay hasta el momento en el porcino sobre el marcaje de TLR9 en el timo, pulmón y bazo mediante IQH. Vemos que el TLR9 se detecta de forma constitutiva en células de alrededor de los folículos linfoides (tipo epitelial, dendrítica, macrófago o linfocito) de linfonodos, tonsila y placas de Peyer, sugiriendo que probablemente este receptor puede jugar un papel importante en la activación el sistema inmunitario de los cerdos.

El segundo estudio de esta tesis consistió en determinar la variación de la expresión de TLR 3, 7 y 9 a lo largo del tiempo en una población de células presentadoras de antígeno. La población de estudio elegida fue la de macrófagos alveolares porcinos (PAMs). Se escogieron estas células por varias razones. En primer lugar porque expresan los TLRs endosomales que estudiamos; en segundo lugar por tratarse de una de las primeras líneas de defensa contra patógenos víricos respiratorios y, en tercer lugar, por la facilidad de obtención y manipulación estas células (se pueden obtener en grandes cantidades y congelar hasta su posterior uso). Además, los PAMs son las células diana del virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV) que ha sido también objeto del tercer estudio.

Los resultados de la cinética de expresión nos han mostrado que los macrófagos alveolares porcinos obtenidos mediante protocolos convencionales de lavado bronco-alveolar mostraban una expresión basal elevada de TLR3 y TLR9. Esta expresión basal se observó en macrófagos obtenidos de distintos crioviales de un mismo animal como en macrófagos provenientes de distintos animales. El porcentaje de células que expresaban estos TLR y la intensidad de la expresión podían variar pero siempre eran sustancialmente altos. Una de las explicaciones posibles para este marcaje basal podría señalar a la necesaria manipulación de estas células antes de ser congeladas. Por otra parte, es imposible conocer con exactitud el ambiente en el cual se encontraban estos macrófagos en el pulmón antes de ser recogidos (concentración de interleuquinas, quimioquinas, otras moléculas, presencia de microorganismos, etc.). Dado que los animales donantes de PAMs estaban sanos, no presentaban ningún tipo de lesión pulmonar y eran libres de los patógenos víricos comunes del cerdo (por ejemplo circovirus porcino de tipo 2, influenza A y PRRSV entre otros) la causa de esta elevada expresión no está clara. Ahora bien, la presencia de otras sustancias coestimuladoras como el LPS, o la existencia de virus porcinos endógenos o no conocidos podrían estar produciendo los resultados observados.

Discusión

De hecho, estudios recientes afirman que la presencia de LPS regula positivamente la expresión de mRNA de diferentes TLR 2, 4, 5 y 9 en lechones (Islam, 2012). Por lo tanto uno de los puntos que se deberían haber tenido en cuenta sería determinar los niveles de LPS que contenían los cultivos de PAMs que se descongelaban para su estudio, aunque no sería suficiente para revelar el porqué de esta alta expresión basal.

En cuanto a la expresión del TLR7, apenas se pudo detectar una expresión basal en los PAMs utilizados. Suponemos que esto se debe a que la estimulación de la expresión de este receptor depende de la presencia de fragmentos de cadena simple de RNA vírico y, como se ha mencionado anteriormente, los PAMs procedían de animales libres de los virus RNA porcinos más comúnmente presentes en el pulmón. Tampoco existe en la bibliografía información sobre una posible expresión constitutiva basal del TLR7 en PAMs o macrófagos alveolares de otras especies, con la que poder contrastar resultados.

La alta expresión basal de TLRs que presentan los PAMs durante las primeras horas de incubación podría repercutir negativamente en otros estudios por diversas causas. La primera, si la expresión basal es muy alta podría pasar que estímulos que de hecho inducen esta expresión en estas células aparecieran como inefectivos, ya que estas células estarían en un estado refractario a los estímulos. Contrariamente, estímulos neutros podrían aparecer como inhibidores porque es más fácil pasar de una estimulación alta a una más baja que no pasar a una todavía más alta. Otro punto a tener en cuenta sería si este marcaje es específico o no a tiempos iniciales. En principio es difícil de creer que un anticuerpo dé marcaje inespecífico al principio y luego sea específico, por lo que esto conlleva a pensar si la expresión de los TLRs en PAMs es constitutiva o inducida o bien si se trata de un problema meramente técnico subyacente a todo el experimento.

Posteriormente, a partir de las 24-48 horas hay una disminución general de la expresión de estos TLRs sobre todo del TLR3 y TLR7. Probablemente el proceso de transcripción de los TLRs también es dependiente del tiempo de incubación, de manera que puede ser que los macrófagos obtenidos de los pulmones tuvieran ya proteína preformada en el organismo del animal vivo y a la hora de descongelarse reaccionaran como aumento de la expresión de la proteína TLR3; hipótesis de difícil demostración. Por otra parte, podemos suponer que la bajada de la expresión de los receptores después de las 12-24 horas está relacionada con la falta de un ambiente de citoquinas endógenas del organismo que estimulen la expresión de

Discusión

dichos TLRs. Esta segunda hipótesis sería fácilmente contrastada midiendo los niveles de citoquinas en los cultivos controles de PAMS sin estimular ni infectar.

Por todo ello, se plantea un problema metodológico muy importante: cuando se utilizan PAMs para el examen de la expresión de TLRs (y por extensión, cualquier otra célula primaria), ¿debe esperarse a que los niveles de expresión iniciales de los TLRs endosomales retornen a valores próximos a cero o debemos asumir un porcentaje elevado de expresión como fondo de la prueba? La metodología correcta sería ir a un modelo animal bien conocido inmunológicamente y esperar a que estas células no tuvieran un marcaje basal positivo. Que la decisión no resulta simple puesto que si se emplean células que se han dejado reposar durante 24-48 horas, los experimentos se realizarían con células envejecidas que fenotípicamente se alejarían de los cultivos de PAMs iniciales. La opción alternativa, trabajar con estas células teniendo en cuenta esta expresión basal, implica una dificultad adicional para comparar los resultados entre experimentos. En el fondo se trata de la disyuntiva entre un modelo más cercano a la realidad pero mucho menos controlable frente a otro más controlable pero más artificioso. En nuestra opinión la primera opción es preferible para dotar de mayor sentido biológico a los resultados.

Para el tercer estudio de esta tesis se buscó un modelo de infección con un virus RNA que pudiera influir en la regulación de estos TLRs y además pudiera añadir información nueva al conocimiento inmunológico de esa infección. En el campo de las enfermedades infecciosas del porcino, una de las mayores incógnitas inmunológicas del momento la encontramos en la infección con el virus del PRRS, un virus con una gran diversidad antigénica y genética. Se decidió trabajar con este virus por tres motivos: primero, para ver el efecto de la variabilidad genética y antigénica del PRRSV en la regulación de la respuesta innata, en concreto en la expresión de los TLRs endosomales en PAMs; segundo, para determinar la cinética de regulación de estos TLRs en PAMS infectados; y tercero, para establecer si de la dosis vírica infectiva tiene efecto en la regulación de los TLRs en los cultivos de PAMs.

En cuanto al punto primero, de la amplia variedad de cepas de PRRSV se seleccionaron dos cepas muy diferentes en cuanto al perfil de inducción de citoquinas (Gimeno *et al.*, 2011), al patrón de deleciones en la nsp2 y las variaciones de la nsp1 (Darwich *et al.*, 2011) que se ha involucrado en la regulación de las respuestas de IFN- α y TNF- α por parte del virus (Beura *et*

Discusión

al., 2010; Chen *et al.*, 2010) y al comportamiento inmunopatogénico *in vivo* (Díaz *et al.*, 2012).

El virus del PRRS es un virus RNA de cadena simple (ssRNA) perteneciente a la familia de los Nidovirales que en su ciclo de replicación acumula doble cadenas (dsRNA) (Perlman y Netland, 2009; van Hemert *et al.*, 2008) y por eso se supone que el virus es capaz de regular la activación de la cascada del TLR3 de la misma forma que del TLR7. Está demostrado que el pre-tratamiento *in vitro* de los macrófagos con dsRNA disminuye la infección por el PRRSV (Sang *et al.*, 2008b; Miller *et al.*, 2009), seguramente por una activación de los TLRs intracelulares, como el TLR3, que a su vez activaría la cascada del NF- κ B y la producción de interferones de tipo I (Akira y Takeda, 2004; Bowie y Unterholzner, 2008). Sin embargo los resultados publicados con el PRRSV como modelo de infección son muy dispares. Mientras unos autores describen una activación de la producción de mRNA de TNF- α en PAMs a partir de las 30 horas post infección (Ait-Ali *et al.*, 2007), otros observan que el PRRSV es capaz de suprimir la expresión de IFN- α (Miller *et al.*, 2009). Nuestros resultados demuestran que dos cepas del mismo genotipo presentan también una estimulación diferente de la vía del TLR3 y en consecuencia del patrón de citoquinas pro-inflamatorias. En concreto, la cepa 3262, al inducir la expresión de TLR3 en los macrófagos alveolares, activa e induce la producción de TNF- α^+ , en cambio la 3267 que activa menos el TLR3 no induce ninguna citoquina pro-inflamatoria; sugiriendo en definitiva, que la regulación del patrón de citoquinas antivirales o pro-inflamatorias en los macrófagos depende del tipo de cepa utilizada.

Respecto a la regulación de TLR7 los datos de los experimentos presentados en la presente tesis indican un aumento de la expresión de este receptor a las 48 horas de infección con la cepa 3262 empleando una m.o.i de 1, pero no con la m.o.i. de 0,1. Este dato sugiere que en el caso de TLR7, la regulación de este receptor posiblemente se produce en las células infectadas pero no en las que no lo están ya que la observación de la expresión depende de la multiplicidad de infección empleada.

Por lo que respecta a TLR9, este receptor además de influir en la modulación de la respuesta frente a infecciones bacterianas respiratorias puede estar involucrado en la respuesta antivírica. En nuestro caso, la infección con las cepas 3262 y 3267 inducía una ligera estimulación del TLR9 sobre todo a partir de las 24 horas, independientemente de la dosis y cepa utilizada. Tampoco se hallaron diferencias en la cantidad de transcritos de mRNA detectados. Por ello,

Discusión

parece ser que la variabilidad antigénica y genética del PRRSV no es muy relevante en cuanto a la regulación del TLR9 en los PAMs.

Por otra parte resulta destacable comentar que la infección con distintas cepas de PRRSV no tenía un efecto sustancial, o no al menos durante las primeras 24 horas, sobre la transcripción relativa de los distintos TLR en relación a la transcripción de β -actina en los PAMs infectados. Estos resultados, que concuerdan con lo observado por Sang *et al.* (2008a) y Chaung *et al.* (2010), sugieren que la regulación de los TLRs que examinamos, y fundamentalmente del TLR3, se produce a nivel post-transcripcional. La hipótesis probablemente más coherente con los resultados observados indicaría la existencia de un nivel más o menos constante de producción de transcritos de los distintos TLRs cuya traducción es regulada por algún mecanismo. La infección con ciertas cepas de PRRSV podría resultar en la alteración (o inhibición) de dicho mecanismo por lo que aumentaría la cantidad de proteína traducida sin que existiera de hecho un aumento de la transcripción del gen correspondiente.

Actualmente se sabe que la transducción de la señalización de los TLRs depende de 5 proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR: MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88), Mal (MyD88-adaptor-like protein), TRIF (TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN- β), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) y SARM (sterile α - and armadillo-motif-containing protein) (O'Neill y Bowie, 2007). Entre estas 5 moléculas, la SARM1 ha sido la más recientemente identificada y ejerce una regulación inhibitoria del sistema inmune. En concreto, esta proteína regula negativamente el NF- κ B en la vía de señalización dependiente de TRIF y disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-8 y TNF- α). En relación al PRRSV como virus RNA, se ha descrito que puede estimular la actividad del NF- κ B en PAMs a partir de las 36 horas PI (Lee y Kleiboeker, 2005); y recientemente, Zhou *et al.* (2011) ha demostrado que PAMs infectados con una cepa altamente patógena (genotipo americano, WUH3) del PRRSV tenían una regulación negativa de la SARM1 porcina. Esta expresión disminuida de la SARM1 puede influir en la activación de genes que codifican para factores como el NF- κ B, IRF3 o el IRF7 (Zhou *et al.*, 2011). Como resultado, parece ser que estas cepas más patógenas ejercen un efecto inhibitorio de la SARM1 que a su vez repercute en un incremento de la activación de la vía de los TLRs, y termina en una respuesta inflamatoria aguda, muerte celular y daño tisular que caracterizan estos casos graves de infección (Zhou *et al.*, 2011).

Discusión

Los resultados de la presente tesis demuestran que ambas cepas de PRRSV utilizadas en este estudio inducían la expresión de TLR3 a partir de 24 horas de infección y que con la cepa 3262 este aumento de TLR3 era mucho más marcado, sobre todo a dosis elevadas (m.o.i.=1). La cepa 3262 era inductora de TNF- α en PAMs, con un pico de producción máximo que se observaba a las 24 horas post-infección. Este efecto no se observó con la cepa 3267 ni con la cepa vacunal. Estas diferencias resultan interesantes y apuntan a que distintas cepas de campo de genotipo europeo poseen un patrón diferente de regulación del TLR3 y de citoquinas relacionadas y una patogenia distinta en el animal. Esto nos conduce a pensar que estas cepas podrían ejercer un efecto inhibitorio sobre la SARM1 de diferente intensidad que se debería confirmar en futuros estudios. Es decir, tenemos una cepa, la 3267, que se replica mucho en PAMs, no induce citoquinas y estimula menos el TLR3, que resulta en unos modelos de infección *in vivo* de viremia más persistente (Díaz *et al.*, 2012) y que sería compatible con una menor capacidad de regulación o inhibición de la SARM1 o de otras moléculas inhibitorias; en cambio, la cepa 3262, que se replica menos, induce citoquinas y regula positivamente el TLR3 y produce infecciones más cortas, que sería compatible con una mayor capacidad de inhibición de estas moléculas inhibitorias como la SARM1. Esta última situación simularía un modelo de atenuación de una cepa vírica. En otras palabras, si se pudieran reproducir condiciones similares a la cepa 3262 se podría lograr atenuar los efectos de una infección con una cepa virulenta.

El conjunto de resultados obtenidos en esta tesis doctoral sugieren que el PRRSV probablemente es capaz de regular la respuesta innata por la vía de los receptores Toll-like intracelulares y de sus moléculas asociadas en la señalización de forma muy distinta. Además esta regulación depende de diferentes factores tales como: cepa vírica, el tiempo de infección y la dosis infectiva inicial. Nuestros resultados pueden ser útiles para abrir y conducir una nueva línea de investigaciones orientadas hacia el área de la inmunidad innata frente al PRRSV.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El patrón de expresión del TLR9 en los distintos tejidos porcinos es similar al descrito en la especie humana; en consecuencia, el cerdo podría servir de modelo alternativo para estudios de inmunohistoquímica de tejidos humanos. En tal caso, antes se debería estipular el método de fijación a que se someterían los tejidos y la edad del animal, puesto que de estos factores depende el éxito del marcaje inmunohistoquímico para el TLR9.
2. Los macrófagos alveolares de cerdos sanos tienen una elevada expresión basal de TLR3 y TLR9. Este hecho implica una dificultad metodológica importante si se quiere trabajar con este tipo de células como modelo experimental ya que complica la valoración en la inducción de la expresión de los mencionados TLRs por parte de otros estímulos.
3. La infección por el PRRSV produce una regulación positiva del TLR3 pero no influye en la regulación del TLR7 y TLR9. En concreto, cepas que se replican a diferentes títulos en los macrófagos alveolares regulan de forma distinta el TLR3 y cepas que no se replican en macrófagos, como es el caso de la cepa vacunal, no tienen efecto alguno sobre esta regulación. Estos resultados sugieren que la activación del TLR3 está relacionada con la replicación vírica y no con la mera presencia de componentes víricos en los cultivos.
4. La expresión de los genes de los TLRs estudiados es constante en términos de los niveles relativos de mRNA; sin embargo, la cantidad de proteína de estos receptores es diferente según la cepa que se use para estimular a los macrófagos. Este hecho sugiere que la regulación por parte del virus podría suceder en un nivel post-transcripcional, regulando la expresión de moléculas inhibitorias de la cascada de señalización del TLR3. Este efecto dependería a su vez de factores diversos tales como el tipo de cepa vírica, el tiempo de infección y la dosis infectiva inicial.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aasted B., Bach P., Nielsen J., Lind P. (2002) Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Clin Diagn Lab Immunol.* 9: 1229-1234

Ahuja S.S., Reddick R.L., Sato N., Montalbo E., Kostecki V., Zhao W., Dolan M.J. et al. (1999) Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection // *J Immunol* 163: 3890-3897

Ait-Ali T., Wilson A.D., Westcott D.G., Clapperton M., Waterfall M., Mellencamp M.A., Drew T.W., Bishop S.C., Archibald A.L. (2007) Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages // *Viral Immunol.* 20: 105-118

Akira S., Takeda K., Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity // *Nat Immunol* 2: 675-680

Akira S., Takeda K. (2004) Toll-like receptor signaling // *Nat Rev Immunol.* 4: 499-511

Albina E., Piriou L., Hutet E., Cariolet R., L'Hospitalier R. (1998) Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Vet Immunol Immunopathol.* 61: 49-66

Alexopoulou L., Holt A.C., Medzhitov R., Flavell R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3 // *Nature* 413: 732-738

Amati L., Pepe M., Passeri M.E., Mastronardi M.L., Jirillo E., Covelli V. (2006) Toll-like receptor signaling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization // *Curr Pharm Des* 12: 4247-4254

An T.Q., Zhou Y.J., Liu G.Q., Tian Z.J., Li J., Qiu H.J., Tong G.Z. (2007) Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of PRRSV isolates in mainland China from 1996 to 2006: coexistence of two NA-subgenotypes with great diversity // *Vet Microbiol.* 123: 43-52

Armant M.A., Fenton M.J. (2002) Toll-like receptors family of pattern-recognition receptors in mammals // *Genome Biology.* 3: 3011.1-3011.6

Bautista C., Mosqueda J. (2005) Papel de los receptores tipo Toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria // *Vet. Méx.* 36: 453-458

Bautista E.M., Molitor T.W. (1999) IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages // *Arch. Virol.* 144: 1191-200

Benfield D.A., Nelson E.A., Collins J.E., Harris L., Goyal S. M., Robison D., Christianson W.T. et al. (1992). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332) // *J. Vet Diag Invest* 4: 127-133

Bibliografía

Beura L.K., Sarkar S.N., Kwon B., Subramaniam S., Jones C., Pattnaik A.K., Osorio F.A. (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation // *J Virol.* 84: 1574-1584

Beutler B., Hoebe H., Ulevitch R.J. (2003) How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and transducers // *J Leukoc Biol.* 74: 479-485

Beutler B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling // *Nature* 430: 257-263

Bowie A.G. (2007) Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity // *Clin Exp Immunol* 147: 217-226

Bowie A.G., Unterholzner L. (2008) Viralevasion and subversion of pattern-transducer for interleukin-1 // *Nature.* 383: 443-446

Bsibsi M., Persoon-Deen C., Verwer R.W., Meeuwse S., Ravid R., Van Noort J.M. (2006) Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators // *Glia.* 53: 688-695

Buddaert W., Van Reeth K., Pensaert M. (1998) In vivo and in vitro interferon (IFN) studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Adv Exp Med Biol.* 440: 461-467

Burkey T.E., Skjolas K.A., Dritz S.S., Minton J.E. (2007) Expression of Toll-like receptors, interleukin 8, macrophage migration inhibitory factor, and osteopontin in tissues from pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium or serovar choleraesuis // *Vet Immunol Immunopathol.* 115:309-319

Calvert J.G., Slade D.E., Shields S.L., Jolie R., Mannan R.M., Ankenbauer R.G., Welch S.K. (2007) CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses // *J Virol.* 81: 7371-7379

Calzada-Nova G., Schnitzlein W., Husmann R., Zuckermann F.A. (2010) Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists // *Vet Immunol Immunopathol.* 135: 20-33

Carrillo-Esper R. (2003) Inmunidad innata, receptores Toll y sepsis // *Cir Cir* 71: 252-258

Cavanaugh D. (1997) Nidovirales: a new order comprising coronaviridae and arteriviridae // *Arch Virol* 142: 629-633

Chang H.C., Peng Y.T., Chang H.L., Chung H.C., Chung W.B. (2008) Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Vet Microbiol.* 129: 281-293

Chung H.C., Chen C.W., Hsieh B.L., Chung W.B. (2010) Toll-like receptor expressions in porcine alveolar macrophages and dendritic cells in responding to poly IC stimulation and

Bibliografía

porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 33: 197-213

Chen Z., Zhou X., Lunney J.K., Lawson S., Sun Z., Brown E., Christopher-Hennings J., Knudsen D., Nelson E., Fang Y. (2010) Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response // *J Gen Virol.* 91:1047-57

Choi C., Cho W.S., Kim B., Chae C. (2002) Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) // *J Comp Pathol.* 127: 106-113

Christianson W.T., Choi C.S., Collins J.E., Molitor T.W., Morrison R.B., Joo H.S. (1993) Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses // *Can J Vet Res.* 57: 262–268

Chuang T.H, Ulevitch R.J. (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR 7, hTLR8 and hTLR9 // *J Eur. Cytokine Netw.* 11: 372-378

Conzelmann K.K., Vissen N., Van Woensel P., Thiel H.J. (1993) Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus Group // *J Virol.* 193: 329-339

Costers S., Lefebvre D.J., Delputte P.L., Nauwynck H.J. (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages // *Arch Virol.* 153: 1453-1465

Dabbagh K., Lewis D.B. (2003) Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses // *Curr Opin Infect Dis.* 16:199-204

Darwich L., Gimeno M., Diaz I., Sibila M., Dotti S. et al. (2011) Genetic and immunobiological diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains // *Vet Microbiol* 150: 49-62

Darwich L., Díaz I., Mateu E. (2010) Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology // *Virus Res.* 154: 123-32. Review.

Das P.B., Dinh P.X., Ansari I.H., Lima M., Osorio F.A., Pattnaik A.K. (2010) The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163 // *J Virol.* 84: 1731-1740

Dea S., Gagnon C.A., Mardassi H., Milane G (1996) Antigenic variability among North American and European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as defined by monoclonal antibodies to the matrix protein // *J Clin Microbiol* 34: 1488-93

Dea S., Gagnon C.A., Mardassi H., Pirzadeh B., Rogan D. (2000) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates // *Arch Virol.* 145: 659-88

Bibliografía

Delputte P.L., Meerts P., Costers S., Nauwynck H.J. (2004) Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages // *Vet Immunol Immunopathol.* 102:179-88

Delputte P.L., Vanderheijden N., Nauwynck H.J., Pensaert M.B. (2002) Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages // *J Virol.* 76: 4312-4320

Delputte, P.L., Costers, S., Nauwynck, H.J. (2005) Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulfate and sialoadhesin // *J Gen Virol.* 86: 1441–1445

Delputte P.L., Van Breedam W., Delrue,I., Oetke C., Crocker P.R., Nauwynck H.J. (2007) Porcine arterivirus attachment to the macrophage-specific receptor sialoadhesin is dependent on the sialic acid-binding activity of the N-terminal immunoglobulin domain of sialoadhesin // *J Virol.* 81: 9546–9550

Díaz I., Mateu E. (2005) Use of ELISPOT and ELISA to evaluate IFN-gamma, IL-10 and IL-4 responses in conventional pigs // *Vet Immunol Immunopathol.* 106: 107-112

Díaz I., Darwich L., Pappaterra G., Pujols J., Mateu E. (2006) Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs // *J Virol.* 351: 249-259

Díaz I., Gimeno M., Darwich L., Navarro N., Kuzemtseva L., Lopez S., Galindo I., Segales J., Martin M., Pujols J., Mateu E. (2012) Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection // *J Vet Res.* en Press.

Diebold S.S., Kaisho T., Hemmi H., Akira S., Reis E., Sousa C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA // *Science* 303: 1529

Domingo E. (1998) Quasispecies and the implications for virus persistence and escape // *Clin Diagn Virol.* 10: 97-101

Drew T.W., Lowings J.P., Yapp F. (1995) Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the UK // *Vet Microbiol.* 55: 209-221

Duan X., Nauwynck H.J., Pensaert M.B. (1997a) Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Vet Microbiol.* 56: 9-19

Duan X., Nauwynck H.J., Pensaert M.B. (1997b) Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages syndrome virus (PRRSV) // *Arch Virol.* 142: 2483-2497

Bibliografía

Edelmann K.H., Richardson-Burns S., Alexopoulou L., Tyler K.L., Flavell R.A., Oldstone M.B. (2004) Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? // *Virology* 322: 231–238

Enlers S., Bulfone-Paus S. (2004) Shaping adaptive immunity against pathogens: the contribution of innate immune responses// *Novel Vaccination Strategies*. Edited by Stefan H. Kaufmann. Copyright. WILEY-VCH VerlagGmbH&Co. KgaA. Weinheim, pp:19-50.

Fang Y., Snijder E.J. (2010) The PRRSV replicase: exploring the multifunctionality of an intriguing set of nonstructural proteins // *Virus Res.* 154: 61-76

Flores-Mendoza L., Silva-Campa E., Reséndiz M., Osorio F.A., Hernández J. (2008) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production // *Clin Vaccine Immunol.*15: 720-725

Forsberg R., Storgaard T., Nielsen H.S., Oleksiewicz M.B., Cordioli P., Sala G., Hein J., Botner A. (2002) The genetic diversity of European type PRRSV is similar to that of the North American type but is geographically skewed within Europe // *J Virol.* 299: 38-47

Forsberg R. (2005) Divergence time of porcine reproductive and respiratory syndrome virus subtypes // *Mol Biol Evol.* 22:2131-2134

Foster S.L., Hargreaves D.C., Medzhitov R. (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications // *Nature* 447: 972-978

Fujihara M., Muroi M., Tanamoto K., Suzuki T., Azuma H., Ikeda H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex // *Pharmacol Ther* 100: 171-194

Gay N.J., Keith F.J. (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor // *Nature* 351: 355–356

Gravell M., London W.T., Leon M.E., Palmer A.E., Hamilton R.S. (1986) Differences among isolates of simian hemorrhagic fever (SHF) virus // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 181: 112-119

Goldberg T.L., Hahn E.C., Weigel R.M., Scherba G. (2000) Genetic, geographical and temporal ariation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois // *J Gen Virol.* 81: 171-179

Goldberg T.L., Lowe J.F., Milburn S.M., Firkins L.D. (2003) Quasispecies variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during natural infection // *Virology.* 317: 197-207

Gimeno M., Darwich L., Diaz I., de la Torre E., Pujols J., Martín M, Inumaru S. *et al.* (2011) Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates // *J Vet Res* 42: 9

Hacker, H., Vabulas, R. M., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S. and Wagner, H. (2000) Immune cell activation by bacterial CpG DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 // *J Exp Med.* 192: 595

Bibliográfia

- Halbur P.G., Paul P.S., Meng X.J., Lum M.A., Andrews J.J., Rathje J.A. (1996)** Comparative pathogenicity of nine U.S. porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a 5-week-old cesarean-derived-colostrum deprived pig model // *J Vet Diagn Invest.* 8: 11-20
- Hanada K., Suzuki Y., Nakane T., Hirose O., Gojobori T. (2005)** The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses // *Mol Biol Evol.* 22: 1024-31
- Hao X., Lu Z., Kuang W., Sun P., Fu Y., Wu L., Zhao Q. et al. (2011)** Polymorphic genetic characterization of the ORF7 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in China // *J Virol.* 8:73
- Hart O.M., Athie-Morales V., O'Connor G.M., Gardiner C.M. (2005)** TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production // *J Immunol.* 175: 1636-1642
- Hasan U., Chaffois C., Gaillard C. Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guet C. et al. (2005)** Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88 // *J Immunol.* 174: 2942-2950
- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akira S., Underhill D.M., Aderem A. (2001)** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5 // *Nature* 410: 1099-1103
- Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenber F., Kirschning C., Akira S., Lipford G. et al. (2004)** Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8 // *Science* 303: 1526
- Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M. et al. (2000)** A toll-like receptor recognizes bacterial DNA // *Nature* 408: 740-745
- Hemmi H., Kaisho T., Takeuchi O., Sato S., Sanjo H., Hoshino K., Horiuchi T. et al. (2002)** Small antiviral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway // *Nat Immunol.* 3: 196-200
- Hochi N., Hashimoto Y., Kitagawa H., Kon Y., Kudo N. (1986)** Histological and immunohistochemical studies on the architecture of lymph nodes in pig // *Jpn J Vet Sci.* 48: 1097-1107
- Hornef M.W., Wick M.J., Rhen M., Normark S. (2002)** Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses // *Nat Immunol.* 3: 1033-1040
- Hornef M.W. (2005)** The role of epithelial TLR expression in host defense and microbial tolerance // *J Endot Res.* 11: 124-128
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., Hartmann G. (2002)** Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides // *J Immunol.* 168: 4531-4537

Bibliográfia

Indik S., Valíček L., Klein D., Klánová J. (2000) Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *J Gen Virol.* 81: 2497-2502

Islam M.A., Cinar M.U., Uddin M.J., Tholen E., Tesfaye D., Looft C., Schellander K. (2012) Expression of Toll-like receptors and downstream genes in lipopolysaccharide-induced porcine alveolar macrophages // *Vet Immunol Immunopathol.* 146: 62-73

Iwasaki A., Medzhitov R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses // *Nat Immunol.* 5: 987-995

Jonjic N., Jonjic S., Saalmuller A., Rukavina D., Koszinowski U.H. (1987) Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues // *Immunology.* 60: 395-401

Kapur V., Elam M.R., Pawlovich T.M., Murtaugh M.P. (1996) Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the Midwestern United States // *J Gen Virol.* 77: 1271-1276

Karniychuk U.U., Geldhof M., Vanhee M., Van Doorselaere J., Saveleva T.A., Nauwynck H.J. (2010) Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate // *BMC Vet Res.* 6: 30

Katz J.B., Shafer A.L., Eernisse K.A., Landgraf J.G., Nelson E.A. (1995) Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3 // *Vet Microbiol.* 44: 65-76

Kaufmann S.H.E., Schaipe U.E. (2005) Antigen presentation and recognition in bacterial infections // *Curr Opin Immunol.* 17: 79-87

Kawai T., Adachi O., Ogawa T., Takeda K., Akira S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin // *Immunity* 11: 115-122

Keffaber K.K. (1989) Reproductive failure of unknown etiology // *Am Assoc Swine Pract Newsletter* 1: 1-19

Kim H.S., Kwang J., Yoon I.J., Joo H.S., Frey M.L. (1993) Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line // *Arch Virol* 133: 477-483

Kim J.K., Fahad A.M., Shanmukhappa K., Kapil S. (2007) Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10 // *J Virol.* 80: 689-696

Kleiboeker S.B., Schommer S.K., Lee S.M., Watkins S., Chittick W., Polson D. (2005) Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR // *J Vet Diagn Invest.* 17:165-170

Bibliografía

- Krieg A.M. (2002)** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects // *Annu Rev Immunol.* 20: 709-714
- Krug A., Luker G.D., Barchet W., Leib D.A., Akira S., Colonna M. (2004)** Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9 // *Blood* 103: 1433–1437
- Kurt-Jones, E.A., Popova L., Kwinn L., Haynes L.M., Jones L.P., Tripp R.A. et al. (2000)** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus // *Nat Immunol.* 1: 398-401
- Labarque G., Van Gucht S., Nauwynck H., Van Reeth K., Pensaert M. (2003)** Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines // *Vet Res.* 34: 249-260
- Labarque G., Reeth K.V., Nauwynck H., Drexler C., Van Gucht S., Pensaert M. (2004)** Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy // *Vaccine* 22: 4183-4190
- Lamontagne L., Pagé C., Larochelle R., Magar R. (2003)** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of experimentally infected pigs depends on the level of CD8high T cells // *Viral Immunol.* 16: 395-406
- Larochelle R., D'Allaire S., Magar R. (2003)** Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Québec // *Virus Res.* 96: 3-14
- Le Gall A., Legeay O., Bourhy H., Arnauld C., Albina E., Jestin A. (1998)** Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Virus Res.* 54: 9-21
- Lee S.M., Schommer S.K., Kleiboeker S.B. (2004)** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates differ in in vitro interferon phenotypes // *Vet Immunol Immunopathol.* 102: 217-31
- Lee S.M., Kleiboeker S.B. (2005)** Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation // *Virology.* 342: 47-59
- Lee Y.J., Lee C. (2010)** Deletion of the cytoplasmic domain of CD163 enhances porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication // *Arch Virol.* 155: 1319-1323
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. (1996)** The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults // *Cell* 86: 973–983
- Li B., Fang L., Xu Z., Liu S., Gao J., Jiang Y., Chen H., Xiao S. (2009)** Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses // *Emerg Infect Dis.* 15:2032-2035

Bibliografía

Li Y., Wang X., Jiang P., Wang X., Chen W., Wang X., Wang K. (2009) Genetic variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in China from 2002 to 2007 based on ORF5 // *Vet Microbiol.* 138: 150-5

Lindhaus W., Lindhaus B. (1991) Raetselhafte Schweinkrankheit // *Prakt Tierarzt*, 5: 413-425

Liu C.H., Chaung H.C., Chang H.L. Peng Y.T., Chung W.B. (2009) Expression of Toll-like receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *J Vet Microbiol.* 136: 266-276

Liu C.H., Shi W., Zhou E., Wang S., Hu S., Cai X., Rong F. et al. (2010) Dynamic changes in inflammatory cytokines in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Clin Vaccine Immunol.* 17: 1439-1445

Liu D., Zhou R., Zhang J., Zhou L., Jiang Q., Guo X. et al. (2011) Recombination analyses between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vivo // *Virus Res.* 155: 473-86

Lopez-Fuertes L., Campos E., Domenech N., Ezquerro A., Castro J.M., Dominguez J, Alonso F. (2000) Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF- α in infected macrophages // *Virus Res.* 69: 41-46

Lund J.M., Sato A., Akira S., Medzhitov R., Iwasaki A. (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells // *J Exp Med.* 198: 513-520

Lund J.M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N.C., Gale N.W., Iwasaki A., Flavell R.A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7 // *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 5598-5603

Luo R., Fang L., Jin H., Jiang Y., Wang D., Chen H., Xiao S. (2011) Antiviral activity of type I and type III interferons against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Antiviral Res.* 91: 99-101

Luo R., Fang L., Jiang Y., Jin H., Wang Y., Wang D., Chen H., Xiao S. (2011) Activacion of NF- κ B by nucleocapsid protein of the porcine reproductive and respiratory syndrom virus // *Virus Genes.* 42: 76-81

Magar R., Larochelle R., Nelson E.A., Charreyre C. (1997) Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *J Vet Res.* 61: 69-71

Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Levine, A.M., Fong, S., Lai, M.M. (2006) Hepatitis C virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon and interleukin-6 // *J Virol.* 80: 866-874

Bibliografía

- Makala L.H., Kamada T., Nishikawa Y., Nagasawa H., Igarashi I., Fujisaki K. (2000)** Ontogeny of pig discrete Peyer's patches: distribution and morphometric analysis // *Pathobiology*. 68: 275-282
- Mansson A., Adner M., Cardell L.O. (2006)** Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis // *Respir Res*. 7:36
- Martínez-Lobo FJ, Díez-Fuertes F, Simarro I, Castro JM, Prieto C. (2011)** Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates differ in their susceptibility to neutralization // *Vaccine*. 29: 6928-6940
- Mateu E., Martín M., Vidal D. (2003)** Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein 5 of European-type porcine reproductive and respiratory virus strains in Spain // *J Gen Virol*. 84: 529-534
- Mateu E., Diaz I., Darwich L., Casal., Martin M., Pujols J. (2006)** Evolucion of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005 // *Virus Res* 115: 198-206
- Matsumoto M., Funami K., Tanabe M., Oshiumi H., Shingai M., Seto Y., Yamamoto A., Seya T. (2003)** Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells // *J Immunol*. 171: 3154-1362
- Mazzoni A., Segal D.M. (2004)** Controlling the Toll road to dendritic cell polarization // *J Leukoc Biol*. 75: 721-730
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. (1997)** A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature*. 388: 394-397
- Medzhitov R., Janeway C., Thomas C.A., Li T., Kodama T., Suzuki H. et al. (2000)** Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis // *J Exp Med*. 191: 147-156
- Medzhitov R. (2001)** Toll-like receptors and innate immunity // *Nat Rev Immunol*. 1:135-145. Review.
- Merrell D.S., Falkow S. (2004)** Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis // *Nature*. 430: 250-256
- Meulenbergh J.J., Hulst M.M., Meijer E.J., Moonen P.L., Besten A., Kluyver E.P. et al. (1993)** Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV // *J Virol*. 192: 62-72
- Meulenbergh J.J., Petersen-den Besten A., Kluyver E.P., Moormann R.J., Schaaper W.M., Wensvoort G. (1995a)** Characterizaion of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus // *J Virol*. 206: 155-163
- Meulenbergh J.J., Petersen-den Besten A., de Kluyver EP, Moormann RJ, Schaaper WM, Wensvoort G. (1995b)** Characterization of structural proteins of Lelystad virus // *Adv Exp Med Biol* 380: 271-276

Bibliografía

- Miguel J.C., Chen J., Van Alstine W.G., Johnson R.W. (2010)** Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Vet Immunol Immunopathol.* 135: 314-319
- Miller L.C., Lager K.M., Kehrli M.E. (2009)** Role of Toll-like receptors in activation of porcine alveolar macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Clin Vaccine Immunol.* 16: 360-365
- Moreno C., A.Sánchez-Ibarrola (2003)** Receptores tipo Toll: bases moleculares de la relación entre respuestas innatas y adaptativas del sistema inmunitario // *Rev Med Univ Navarra* 47: 29-33
- Murtaugh M.P., Elam M.R., Kakach L.T. (1995)** Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus // *Arch Virol.* 140: 1451-1460
- Murtaugh M.P., Yuan S., Faberg K.S. (2001)** Appearance of novel PRRSV isolates by recombination in the natural environment // *Adv Exp Med Biol.* 494: 31-36
- Murtaugh M.P., Xiao Z., Zuckermann F. (2002)** Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection // *Viral Immunol.* 15: 533-547
- Nelsen C.J., Yuan S., Murtaugh M.P., Schmitt B.J., Faaberg K.S. (1999)** Recombination between North American strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Virus Res.* 61: 87-98
- Nelson E.A., Christopher-Hennings J., Drew T., Wensvoort G., Collins J.E., Benfield D.A. (1993)** Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies // *J Clin Microbiol.* 31: 3184-3189
- O'Neill L.A. (2006)** Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases // *Nat Rev Drug Discov.* 5: 549-563
- O'Neill L.A., Bowie A.G. (2007)** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling // *Nat Rev Immunol.* 7: 353-64. Review
- O'Neill L.A. (2008)** When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction // *Immunity* 29: 12–20
- Ostrowski M., Galeota J.A., Jar A.M., Platt K.B., Osorio F.A., Lopez O.J. (2002)** Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain // *J Virol.* 76: 4241-4250
- Overend C., Mitchell R., He D., Rompato G., Grubman M.J., Garmendia A.E. (2007)** Recombinant swine beta interferon protects swine alveolar macrophages and MARC-145 cells from infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *J Gen Virol.* 88: 925-931
- Pandey S., Agrawal D.K. (2006)** Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends // *Immunol Cell Biol.* 84: 333-341

Bibliografía

- Park J.Y., Kim H.S., Seo S.H. (2008)** Characterization of interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine dendritic cells // *J Microbiol Biotechnol.* 18: 1709-1716
- Parker L.C., Prince L.R., Sabroe I. (2007)** Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity // *Clin Exp Immunol.* 147: 199-207
- Peng Y.T., Chaung H.C., Chang H.L., Chang H.C., Chung W.B. (2009)** Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Vet Microbiol.* 136: 359-365
- Perlman S, Netland J. (2009)** Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis // *Nat Rev Microbiol.* 7: 439-450
- Pesch S, Meyer C, Ohlinger V.F. (2005)** New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) // *Vet Microbiol.* 107: 31-48
- Pirzadeh B., Dea S. (1997)** Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants // *J Gen Virol.* 78: 1867-1873
- Pirzadeh B., Gagnon C.A., Dea S. (1998)** Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein // *Can J Vet Res.* 62: 170-177
- Pol J.M., van Dijk J.E., Wensvoort G., Terpstra C. (1991)** Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)) // *Vet Q.* 13: 137-143
- Pol J.M., Wagenaar F., Reus J.E. (1997)** Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains // *Vet Microbiol.* 55: 203-208
- Portnoy D.A. (2005)** Manipulation of innate immunity by bacterial pathogens // *Curr Opin Immunol.* 17: 25-28
- Quintana-Murci, L., Alcais, A., Abel, L., Casanova, J.L. (2007)** Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases // *Nature Immunol.* 8: 1165–1171
- Ramos J. (1989)** Estudio inmunológico del sistema inmune del cerdo // Tesis Doctoral. UAB. Barcelona.
- Ranjith-Kumar C., Miller W., Sun J., Xiong J., Santos J., Yarbrough I., Lamb R. et al. (2007)** Effects of Single Nucleotide Polymorphisms on Toll-like Receptor 3 Activity and Expression in Cultured Cells // *J Biol Chem* 282: 17696-17705

Bibliográfia

Rehli M. (2002) Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression // Trends Immunol. 23:375-378

Reitamo S., Reitamo J.J. (1978) Immunoperoxidase identification of intracellular immunoglobulins in human tissues // Amer. J Clin Pathol. 70: 845

Roach J.C., Glusman G., Rowen L., Kaur A., Purcell M.K., Smith K.D., Hood L.E. et al. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors // Proc Natl Acad Sci USA 102: 9577-9582

Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll // Proc Natl Acad Sci USA. 95:588-593

Rossow K.D. (1998) Porcine reproductive and respiratory syndrome // Vet Pathol. 35: 1-20

Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzada-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K. (2004) Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination // Vet Immunol Immunopathol. 102: 199-216

Rowland R.R., Kervin R., Kuckleburg C., Sperlich A., Benfield D.A. (1999) The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence // Virus Res. 64: 1-12

Sabat R., Grutz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. (2010) Biology of interleukin-10 // Cytokine Growth Factor Rev. 21: 331-344

Sang Y., Ross C.R., Rowland R.R., Blecha F. (2008a) Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection // Viral Immunol. 21: 303-313

Sang Y., Yang J., Ross C.R., Rowland R.R., Blecha F. (2008b) Molecular identification and functional expression of porcine Toll-like receptor (TLR) 3 and TLR7 // Vet Immunol Immunopathol. 125: 162-167

Sha Q., Truong-Tran A.Q., Plitt J.R., Beck L.A., Schleimer R.P. (2004) Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists // J Respir Cell Mol Biol. 31: 358-364

Schauber J., Dorschner R., Coda A., Büchau A. Liu P.T., Kiken D., Helfrich Y.R. et al. (2007) Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism // J Clin Invest. 117: 803-811

Schnare M., Holt A.C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R. (2000) Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88 // Curr Biol. 10: 1139-1142

Schneberger D., Lewis D., Caldwell S., Singh B. (2011) Expression of toll-like receptor 9 in lungs of pigs, dogs and cattle // Int J Exp Pathol. 92: 1-7

Bibliografía

- Schroder M., Bowie A.G. (2005)** TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? // Trends Immunol. 26: 462–468
- Schommer S.K., Kleiboeker S.B. (2006)** Use of a PRRSV infectious clone to evaluate in vitro quasispecies evolution // Adv Exp Med Biol. 581: 435-438
- Silva-Campa E., Flores-Mendoza L., Reséndiz M., Pinelli-Saavedra A., Mata-Haro V., Mwangi W., Hernández J. (2009)** Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus // J Virol. 387: 373-379
- Sioud M. (2006)** Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors // Trends Mol Med. 12: 167-176
- Snijder, E.J., Meulenberg, J.J. (1998)** The molecular biology of arteriviruses // J Gen Virol. 79: 961–979
- Song J., Shen D., Cui J., Zhao B. (2010)** Accelerated evolution of PRRSV during recent outbreaks in China // Virus Genes. 41:241-245
- Suárez P., Zardoya R., Martín M.J., Prieto C., Dopazo J., Solana A., Castro J.M. (1996)** Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes // Virus Res. 42: 159-165
- Subramaniam S., Kwon B., Beura L.K., Kuszynski C.A., Pattnaik A.K., Osorio F.A. (2010)** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor-alpha promoter activation by inhibiting NF- κ B and Sp1 // J Virol. 406: 270-279
- Sun R., Zhang Yu, Qingshan Lv, Liu B., Jin M., Zhang W. et al. (2011)** Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform α (TAP63 α) // J Biol Chem. 286: 15918-15928
- Suradhat S., Thanawongnuwech R., Poovorawan Y. (2003)** Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus // J Gen Virol. 84: 453-459
- Stadejek T., Stankevicius A., Storgaard T., Oleksiewicz M.B., Belák S., Drew T.W., Pejsak Z. (2002)** Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses // J Gen Virol. 83: 1861-1873
- Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Potapchuk D., Podgórska K. (2006)** Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes // J Gen Virol. 87: 1835-1841
- Stadejek T., Oleksiewicz M.B., Scherbakov A.V., Timina A.M., Krabbe J.S., Chabros K., Potapchuk D. (2008)** Definition of subtypes in the European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: nucleocapsid characteristics and geographical distribution in Europe // Arch Virol. 153: 1479-1488

Bibliográfia

- Tabeta K., Georgel P., Janssen E., Du X., Hoebe K., Crozat K., Mudd S. et al. (2004)** Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection // *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 3516–3521
- Taguchi T., Mitchman J.L., Dower S.K., Sims JE, Testa JR. (1996)** Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the *Drosophila* transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14 // *Genomics*. 32: 486-488
- Takeda K., Kaisho T., Akira S. (2003)** Toll like receptors // *Annu Rev Immunol*. 21: 335–376
- Takeda K, Akira S. (2005)** Toll-like receptors in innate immunity // *J Int Immunol*. 17: 1-14
- Takeuchi O., Takeda K., Hoshino K., Adachi O., Ogawa T., Akira S. (2000)** Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependet signaling cascades // *J Int Immunol*. 12: 113-117
- Thanawongnuwech R., Young T.F., Thacker B.J., Thacker E.L. (2001)** Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and Mycoplasma hyopneumoniae co-infection model // *Vet Immunol Immunopathol*. 79: 115-127
- Therrien D., St-Pierre Y., Dea S. (2000)** Preliminary characterization of protein binding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells // *Arch Virol*. 145: 1099-1116
- Tohno M., Shimosato T., Mouse M., Aso H., Watanabe K., Kawai. et al. (2006)** Toll-like receptor 2 and 9 expressed and functional in gut-associated lymphoid tissues of presucking newborn swine // *J Vet Res*. 37: 791-812
- Underhill D.M. (2004)** Toll-like receptors and microbes take aim at each other // *Curr Opin Immunol*. 16: 483-487
- Underhill D.M., Gantner B. (2004)** Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity // *Microbes Infect*. 6: 1368-1373
- van Gorp H., Van Breedam W., Delputte P.L., Nauwynck H.J. (2008)** Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *J Gen Virol*. 89: 2943-2953
- van Gucht S., van Reeth K., Pensaert M. (2003)** Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease // *J Clin Microbiol*. 41: 960-966
- van Hemert M.J., de Wilde A.H., Gorbalenya A.E., Snijder E.J. (2008)** The in vitro RNA synthesizing activity of the isolated arterivirus replication/transcription complex is dependent on a host factor // *J Biol Chem*. 283: 16525-16536
- Vanhee M., Costers S., Van Breedam W., Geldhof M.F., Van Doorselaere J., Nauwynck H.J. (2010)** A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory

Bibliográfia

syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains // *J Viral Immunol.* 23: 403-413

van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M. (1999) Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity // *Res Vet Sci.* 67: 47-52

van Vugt J.J., Storgaard T., Oleksiewicz M.B., Bøtner A. (2001) High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity // *J Gen Virol.* 82: 2615-2620

Vercammen E., Staal J., Beyaert R. (2008) Sensing of viral infection and activation of innate immunity by Toll-like receptor 3 // *Clin Microbiol Rev.* 21: 13-25

Wang X., Eaton M., Mayer M., Li H., He D., Nelson E., Christopher-Hennings J. (2007) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability // *Arch Virol.* 152: 289-303

Wang G., Song T., Yu Y., Liu Y., Shi W., Wang S., Rong F. et al. (2011a) Immune responses in piglets infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Vet Immunol Immunopathol.* 142: 170-178

Wang Y., Luo R., Fang L., Wang D., Bi J., Chen H., Xiao S. (2011b) Porcine reproductive and respiratory virus (PRRSV) infection activates chemokine RANTES in MARC-145 cells // *Mol Immunol.* 48: 586-591

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J.M.A., Ter Laak E.A., Bloemraad M, de Kluyver EP, Kragten C. et al. (1991) Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus // *Vet. Q.* 13: 121-130

West A.P., Koblansky A., Ghosh S. (2006) Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors // *Ann Rev Cell Dev. Biol.* 22: 409-437

Wootton S., Yoo D., Rogan D. (2000) Full-length sequence of Canadian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolate // *Arch Virol* 145: 2297-2323

Wu W.H., Fang. Y., Rowland. R.R., Lawson S.R., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Nelson E.A. (2005) The 2b protein as a minor structural component of PRRSV // *Virus Res.* 114: 177-181

Xu J., Yang Y., Sun J., Ding Y., Su L., Shao C., Jiang B. (2006) Expression of Toll-like receptors and their association with cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells of children with acute rotavirus diarrhoea // *Clin Exp Immunol.* 144: 376–381

Yamamoto M., Akirz S. (2005) TIR domain-containing adaptors regulate TLR signaling pathways // *Adv Exp Med Biol.* 560: 1-9

Yin G, Gao L, Shu X, Yang G, Guo S, Li W. (2012) Genetic Diversity of the ORF5 Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolates in Southwest China from 2007 to 2009 // *PLoS One.* 7: 33756

Bibliográfia

Zarembek K.A., Godowski P.J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines // *J Immunol.* 168:554-561

Zhang Y., Sharma R.D., Paul P.S. (1998) Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus // *Vet Microbiol.* 63: 125-36

Zhang X., Shin J., Molitor T.W., Schook L.B., Rutherford M.S. (1999) Molecular responses of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection // *J Virol.* 262: 152-162

Zhang Z., Bashiruddin J.B., Doel C., Horsington J., Durand S., Alexandersen S. (2006) Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection // *J Comp Pathol.* 134: 56–62

Zhou Y.J., Yu H., Tian Z.J., Li G.X., Hao X.F., Yan L.P., Peng J.M. et al. (2008) Genetic diversity of the ORF5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in China from 2006 to 2008 // *Virus Res.* 144: 136-44

Zhou P, Zhai S, Zhou X, Lin P, Jiang T, Hu X, Jiang Y, Wu B, Zhang Q, Xu X, Li JP, Liu B. (2011) Molecular characterization of transcriptome-wide interactions between highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine alveolar macrophages *in vivo*. *Int J Biol Sci.* 7:947-59. Erratum in: *Int J Biol Sci.* 2012; 8:124

Zhou X., Jiang T., Du X., Zhou P., Jiang Z., Michal J.J., Liu B. (2012) Molecular characterization of porcine SARM1 and its role in regulating TLRs signaling during highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection *in vivo* // *Develop Comparat Immun.* Article in press.

8. ANNEXOS

8.1. PUBLICACIONES

Aportaciones en compendio de artículos científicos y participación en congresos realizados durante la tesis doctoral:

Artículos publicados:

1. **Darwich L., Gimeno M., Diaz I., Sibila M., Dotti S., de la Torre E., Kuzemtseva L., Martin M., Pujols J., Mateu E. (2011)** Genetic and immunobiological diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome genotype I strains // *Vet Microbiol* 150: 49-62
2. **Díaz I., Gimeno M., Darwich L., Navarro N., Kuzemtseva L., Lopez S., Galindo I., Segales J., Martin M., Pujols J., Mateu E. (2012)** Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection // *J Vet Res.* en Press.

Aportación en congresos nacionales e internacionales:

1. **Kuzemtseva L., de la Torre E., M.Gimeno, Diaz I., Rodríguez-Gómez I., Cano E., Mateu E., Darwich L. (2011)** Regulation of Toll-like Receptors in alveolar macrophages infected by different Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viral strains // Proc 6th International symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases. Barcelona. P-115
2. **Kuzemtseva L., de la Torre E., Martin D., Schmit O., Gimeno M., Mateu E., Darwich L. (2011)** Regulation of Toll-like Receptors in alveolar macrophages infected by different Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viral strains // British Society for Immunology. Liverpool. *Immunology*, Volume 135, Suppl. 1, P.727.
3. **Kuzemtseva L., de la Torre E., Martin D., Schmit O., Gimeno M., Mateu E., Darwich L. (2011)** Toll-like receptors 3, 7 and 9 are differently regulated in porcine alveolar macrophages depending on the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus strain // Congreso de la Societat Catalana d'Immunologia de l'Academia de Ciències Mèdiques i de la Salut de Catalunya i de Balears. Barcelona, 2011. Comunicació oral.

8.2. COMPOSICIÓN DE LOS BUFFERES

Phosphate buffered saline (PBS):

- 100 µl PBS
- 900 Agua MilliQ

Buffer de lisis para Western Blot:

- 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (1M)
- 150 mM NaCl (2M)
- 2 mM EDTA (0,5 M)
- 0,5% Triton X-100 (10%)
- Protease Inhibitor Cocktail 100 ul/10ml (ROCHE DIAGNOSTICS SL.)

Buffer EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para IHQ:

- 1000 ml H₂O destilada
- 0,372 g EDTA
- 500 µl Tween-20 (pH 8,5)